



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 354 537**

⑫ Número de solicitud: 200801935

⑮ Int. Cl.:
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **27.06.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2011

⑰ Solicitante/s: **Universidad Pública de Navarra
Campus de Arrosadía, s/n
(OTRI) Edificio el Sario
31006 Pamplona, Navarra, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑱ Inventor/es: **Mingo Castel, Ángel;
Farrán Blanch, Inma y
Sanz Barrio, Ruth**

⑲ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

⑳ Título: **Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas.**

㉑ Resumen:

Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas. Se describe la secuencia genética de las tiorredoxina (Trx) cloroplástica *m* y *f* de la especie *N. tabacum*, su método de clonación, expresión en plastidios y aplicaciones. Se proporcionan además los vectores de transformación plastidial que contienen moléculas de ADN que codifican Trx, los hospedadores que los incorporan, especialmente *E. coli* y, particularmente, plantas transgénicas obtenidas con tales vectores, así como su método de obtención y su aplicación en la sobreexpresión de Trx en forma soluble y activa en dichas plantas y en la producción incrementada de almidón.

Los citados vectores plastidiales se aplican a la producción plastidial incrementada de proteínas heterólogas recombinantes, fusionadas con las secuencias de Trx, concretamente albúmina sérica (HSA) y cardiotrofina-1 (hCT1) humanas. Se describen también métodos de obtención de proteínas heterólogas coexpresadas con Trx, biológicamente activas y en conformación nativa; así como la obtención de hCT1 recombinante en forma soluble y con bioactividad incrementada.

ES 2 354 537 A1

DESCRIPCIÓN

Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la Biotecnología, y específicamente a la secuencias genética de la tiorredoxina (Trx) ceroplástica *m* de la especie *N. tabacum*, su método de clonación, expresión en plastidios y aplicaciones. La invención proporciona además los vectores de transformación plastidial que contienen moléculas de ADN que codifican Trx *m*, los hospedadores que los incorporan y, particularmente, plantas transgénicas obtenidas con tales vectores, así como su método de obtención y su aplicación a la sobreexpresión de Trx *m* en forma soluble y activa en dichas plantas.

La invención se aplica además a la producción plastidial incrementada de proteínas heterólogas recombinantes, fusionadas con las secuencias de Trx *m*, concretamente albúmina sérica (HSA) y cardiotrofina-1 (hCT1) humanas. Se describen también métodos de obtención de proteínas heterólogas coexpresadas con Trx *m*, biológicamente activas y/o en su conformación nativa; así como la obtención de hCT1 recombinante con bioactividad incrementada.

20 **Antecedentes de la invención**

Las tiorredoxinas son pequeñas proteínas termoestables (12 kDa) presentes en todos los organismos que catalizan intercambios tiol-disulfuro y regulan el ambiente redox de la célula, controlando un amplio rango de procesos bioquímicos. Esta regulación depende, en la mayoría de los casos, de la capacidad de las tiorredoxinas de reducir puentes disulfuro de proteínas diana. En plantas, el sistema tiorredoxina es particularmente complejo, ya que existen múltiples isoformas y múltiples genes que codifican para cada tipo de tiorredoxina; siendo todos estos genes codificados nuclearmente, independientemente de su localización subcelular.

La multiplicidad de isoformas de tiorredoxinas encontradas en cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*, cuatro isoformas de tiorredoxina *m*, dos *f*, una *x*, y dos *y* hace que surjan dudas respecto a la especificidad y las funciones de las mismas. Las tiorredoxinas más estudiadas hasta la fecha han sido las tiorredoxinas *m* y *f*, por ser las únicas asociadas a la regulación dependiente de la luz del metabolismo del carbono, a través del ciclo de las pentosas fosfato y del ciclo C₄.

Las tiorredoxinas cloroplásticas se denominaron *m* y *f* en función de la enzima que son capaces de activar, la NADP-malato deshidrogenasa (NADP-MDH) y la fructosa-1,6-bis-fosfatasa (FBPasa) respectivamente. Estudios filogenéticos y comparaciones estructurales han demostrado que las tiorredoxinas *m* tienen un origen procariota, están codificadas nuclearmente y se encuentran asociadas débilmente a las membranas externas del tilacoide. Las tiorredoxinas *f* están también codificadas nuclearmente y tienen un origen eucariota.

Las tiorredoxinas cloroplásticas pueden regular procesos tan importantes como: el ciclo de Calvin; el ciclo C₄; el metabolismo del nitrógeno y del azufre; la biosíntesis de ácidos grasos, isoprenoides, tetrapirroles y vitaminas; la traducción; el ciclo de las pentosas fosfato; el estrés oxidativo; el ensamblaje/plegado de proteínas y degradación de las mismas; la degradación del almidón; la glicólisis; la división plastidial y la replicación del DNA. Recientemente se ha descrito la existencia de un completo sistema ferredoxina/tiorredoxina también en amiloplastos, regulando la actividad de enzimas implicadas en procesos tales como el metabolismo del almidón; la biosíntesis de lípidos, aminoácidos y nucleótidos; el plegado de proteínas y otras reacciones varias.

A pesar de la existencia de múltiples estudios sobre la estructura de las tiorredoxinas cloroplásticas, sus funciones y su regulación en la planta, es difícil conocer qué tiorredoxina actúa en cada proceso *in vivo*, debido a la pérdida de especificidad de las tiorredoxinas *m* y *f* mutadas usadas en proteómica y cromatografía de afinidad.

55 *Transformación plastidial*

La información genética de las plantas se encuentra distribuida en tres compartimentos celulares: el núcleo, las mitocondrias y los plastidios. El genoma plastidial (plastoma) es circular de doble hélice, y en plantas superiores difiere en tamaño según la especie entre 120 y 160 kb. El número de copias del plastoma en el plastidio es variable, dependiendo del tipo de plastidio y del tipo de célula, pudiendo llegar a contener hasta 10.000 copias en una célula del mesófilo de la hoja.

En el proceso de transformación plastidial, la integración del ADN en el genoma plastidial se produce por recombinación homologa. Se han probado hasta 14 lugares distintos de inserción en los que no ha habido efectos negativos, si bien los más utilizados han sido la región intergénica del *trnI-trnA* y la del *rrn16/trnV-rps7/12*. El método más utilizado para insertar los vectores en el ADN plastidial ha sido el bombardeo con helio a alta presión (método biolístico). Para detectar la regeneración de transformantes se suelen utilizar marcadores de selección. El más eficiente hasta el momento ha sido el gen *aadA* de bacterias, que codifica la enzima 3'-adenilil-transferasa, y es capaz de inactivar antibióticos tipo aminoglicósidos, como la espectinomicina y la estreptomycin.

Para lograr grandes niveles de acumulación de proteína recombinante, los transgenes se expresan bajo promotores constitutivos fuertes que aseguran altos niveles de ARNm. También se suelen incluir regiones 5'UTR que promuevan una traducción activa y estabilicen los transgenes. La elección de estos elementos resulta crucial para determinar las cantidades finales de acumulación de proteína, pues el inicio de la traducción es el paso limitante. En cambio, la región 3'UTR es importante para estabilizar el ARNm y no parece influir en el nivel de expresión de los transgenes.

La transformación plastidial presenta una serie de ventajas, incluida la capacidad de obtener elevados niveles de expresión de la proteína recombinante, pudiendo llegar a alcanzar hasta el 46% de la proteína soluble total, debido probablemente al elevado número de copias del transgén en la célula. Otras ventajas destacables son: la ausencia de "efecto posición", permitiendo una expresión uniforme y reproducible del gen; la baja probabilidad en el flujo de transgenes a otros cultivos o especies salvajes relacionadas, ya que en la mayoría de las especies cultivadas los plastomas son heredados por vía materna; y la capacidad de procesamiento policistónico, que los capacita para procesar varios transgenes bajo el control de un único promotor.

Las aplicaciones biotecnológicas de la transformación plastidial son amplias (Bock *et al*, 2001, Trends Biotech. **22**, 311-318; Maliga, 2004, Annu. Rev. Plant. Biol. **55**, 289-313). Por una parte, han sido numerosos los estudios para dotar de ventajas agronómicas a los cultivos, como resistencia a insectos o a herbicidas y fitorremediación. También se ha publicado la expresión de moléculas de interés industrial como la xilanasas, trehalosa o el PHB. En una revisión (Heifetz, 2000, Biochim. **82**, 655-666), se recogen además otros trabajos de expresión plastidial que ya han sido patentados (E5 celulasa, aprotinina bovina y tolerancia a herbicidas norflorazon y bromoxynil). La aplicación más extendida ha sido la producción de compuestos biofarmacéuticos en plastidios, probablemente porque las expectativas de mercado son altas y pueden esperarse grandes beneficios (Bock, 2007 Curr. Opin. Biotechnol. **18**, 100-106; Daniell, 2006, Biotech. J. **1**, 1071-1079).

Sobreexpresión de Trx recombinantes en plantas

Existen muy pocos trabajos en los que se han sobreexpresado tiorredoxinas en plantas. Cho *et al* (Cho *et al*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 14641-14646) sobreexpresaron una tiorredoxina *h* de trigo en el endospermo de cebada transgénica, obteniendo un incremento de hasta 4 veces en la actividad de la "starch-debranching enzyme", enzima que rompe de manera específica los enlaces alfa-1,6 en el almidón, en el endospermo de granos transgénicos germinados. También se ha visto que se aceleraba la emergencia de la radícula durante el proceso de germinación (Wong *et al*, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 16325-16330). Asimismo, se ha descrito que la sobreexpresión de tiorredoxina *h* en cereales (trigo y cebada) puede utilizarse para mejorar la calidad harino-panadera del trigo, aumentando la fuerza de la masa (Joudrier *et al*, 2005, Biotech. Adv. **23**, 81-85) y para mitigar la respuesta alérgica a las proteínas del trigo (Buchanan *et al*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 5372-5377) produciendo alimentos hipoalérgicos más digestivos (Joudrier *et al*, citado anteriormente).

Producción de proteínas recombinantes en plantas

Las proteínas recombinantes son un componente de gran importancia en investigación, medicina e industria, siendo necesarias para múltiples aplicaciones, incluyendo las terapéuticas, vacunas, anticuerpos monoclonales, hormonas, proteínas de la sangre, agentes de diagnóstico o enzimas, lo que representa una gran demanda para la producción de proteínas recombinantes a escala industrial.

La producción comercial de proteínas heterólogas ha tenido lugar tradicionalmente en fermentadores microbianos (*E. coli* y levaduras principalmente) y en cultivos de células de mamífero. A continuación se detallan los documentos más próximos a la invención:

EP1609867 describe una construcción y un vector para expresión en *E. coli* y un método para incrementar la producción de polipéptidos recombinantes con elevado rendimiento en el cual una primera secuencia de ácido nucleico codifica una tiorredoxina y una segunda secuencia de ácido nucleico codifica otra proteína tal como hemoglobina o un enzima. Se clona en una célula huésped para obtener el producto de interés evitando el estrés oxidativo que se produce como consecuencia de la sobreexpresión (resumen). La expresión de ambos genes está controlada por promotores iguales o diferentes, constitutivos o inducibles y pueden introducirse secuencias activadoras en los extremos 5' de los promotores (párrafos (0044) a (0047)). Los genes se expresan como proteína de fusión formada por tiorredoxina y otro polipéptido (párrafo (0062)) que se pueden purificar por cromatografía o cualquier otro método estándar (párrafo (0056)). También está descrito que los genes se pueden coexpresar independientemente (párrafo (0052)), siendo las proteínas obtenidas más solubles que cuando no se expresan conjuntamente con TRX (ya sea en fusión o en coexpresión). Sin embargo, la técnica no se realiza en plástidos vegetales sino en *E. coli*.

Parecida es la enseñanza de la solicitud US 2002/0146793, en la que se sugiere la expresión conjunta de una proteína capaz de catalizar la formación de enlaces disulfuro y una proteína heteróloga, siendo el hospedador preferido las levaduras. WO 92/13955, por su parte, se refiere específicamente a una proteína de fusión obtenida a partir de una proteína similar a una Trx y la parte codificante de una proteína heteróloga. El hospedador es, de nuevo, una bacteria.

EP0768382: se refiere a 2 vectores que cotransforman *E. coli*. Uno de ellos lleva una construcción para la expresión de TRX y el otro para expresar una proteína de interés.

ES 2 354 537 A1

WO9213955: se refiere a la expresión en *E. coli* de proteínas de fusión que contienen TRX y una proteína de interés en forma estable y soluble. Estas proteínas deben posteriormente ser separadas y plegadas correctamente.

WO9741207: detalla un método para expresar una proteína heteróloga soluble en una bacteria transformada con un vector que contiene un gen que codifica la proteína heteróloga y un gen que codifica una TRX, expresándose ambos separadamente.

US7655436: describe la coexpresión de TRX en *E. coli* con otras proteínas heterólogas en forma de proteínas de fusión. Se obtienen en forma soluble y activa. Menciona el problema de la acumulación en cuerpos de inclusión, pero simplemente con la construcción de fusión soluciona el problema (ver col. 2 ln 7). (La construcción de fusión en plastidios vegetales, descrita en la presente solicitud, no evita la acumulación de la proteína de interés en cuerpos de inclusión).

WO9837208 (EP1007698 y ES2286844): se refiere a la expresión de proteínas heterólogas en un organismo huésped que se transforma con un vector que lleva una construcción con un gen que codifica una TRX y una construcción que lleva el gen de la proteína heteróloga. Refiere el problema de la acumulación en cuerpos de inclusión. El organismo transformado es una levadura.

Estos sistemas de producción en microorganismos presentan ciertas desventajas en cuanto a coste, producción a escala y seguridad biológica, lo que ha llevado a estudiar otras alternativas. La producción de proteínas recombinantes en plantas ha aparecido como una de las plataformas más prometedoras, ya que permite reducir costes a la vez que eliminar riesgos de contaminación con endotoxinas o patógenos humanos. Además, la producción de proteínas recombinantes en plantas permite obtener vacunas orales que pueden ser administradas en crudo después de un dosificado previo. La producción de proteínas terapéuticas en plantas comenzó hace más de una década, y las especies más utilizadas han sido tabaco, maíz, patata, alfalfa, arroz y soja.

Hasta la fecha, la mayoría de las proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico han sido producidas por transformación nuclear. Aunque esta técnica es bien conocida en muchas especies, tiene algunas desventajas, como la producción en gran escala a corto plazo, los bajos niveles de expresión (normalmente menos del 1% de la proteína soluble total), los problemas derivados de las modificaciones post-traduccionales, el silenciamiento o los efectos de posición (Bogorad, 2000, Trends Biotech. **18**, 257-263). Actualmente, el punto más débil de la producción de proteínas recombinantes en plantas es la falta de información en lo referente a los procesos que engloban la estabilidad, extracción, purificación y rendimiento final de la misma, cuestiones de gran importancia para la viabilidad industrial (Fischer *et al*, 2004, Curr. Op. Plant Biol. **7**, 152-158; Menkhaus, 2004, Biotech. Prog. **20**, 1001-1014).

Una variante es la transformación plastidial, con la que ya se ha conseguido expresar varias proteínas de interés biofarmacéutico con niveles muy altos de acumulación. A continuación se detallan diversos documentos que ilustran esta variante:

WO 00/03012: describe la expresión de péptidos eucariotas en plastidios vegetales.

US 2006/0253935, US 2006/0117412, US 2006/0253935; **Fernández San-Millán** *et al*, 2003, Plant Biotech. J. **1**, 71-79; **Farran** *et al*, 2008, Plant Biotech. J. **6**(5): 516-27: describen la expresión de albúmina sérica (HSA) y cardiotrofina-1 (hCT1) humanas en plastidios vegetales.

WO2007053183: se refiere a un sistema para la expresión multigénica en cloroplastos de tabaco. Se analizan diversas líneas de cloroplastos transgénicos con construcciones multigénicas que contienen las siguientes características: el gen *aadA* que confiere resistencia a la espectinomicina aguas abajo del promotor del gen del RNA 16S constitutivo del cloroplasto (Prr). Los genes heterólogos de interés se disponen aguas abajo del gen *aadA* y están flanqueados por la región *psbA* responsable de la estabilidad en el cloroplasto. En algunos casos el gen heterólogo contiene el promotor *psbA* y su secuencia reguladora 5'UTR. Las construcciones multigénicas se integran mediante recombinación homóloga en la región *trn* del cromosoma plastidial (zona en la que se han integrado con éxito más de 30 genes) (Daniell *et al*. 2004 a,b).

WO0250289: describe un procedimiento para coexpresar en plastidios vegetales una tiorredoxina conjuntamente con un segundo polipéptido (pág.14, líneas 11-15). El sistema de expresión, que consiste en una construcción que incluye el promotor *psbA* y una secuencia 5'UTR, se inserta en un plásmido a través de zonas de recombinación homóloga y se expresa en una célula vegetal o en una planta transformada (ver pág. 56, líneas 20 en adelante y pág. 57, párrafo 1). Como activador de la transcripción, utiliza la secuencia de la región G10L de bacteriófago T7 (pág. 58, líneas 1-10). Los péptidos de fusión obtenidos se separan por ruptura enzimática de una secuencia de unión (página 8, párrafo 1).

En la presente invención se han coexpresado en plastidios proteínas heterólogas con la Trx *m* cloroplástica de la invención, observándose diversos efectos totalmente inesperados, como los elevados niveles de expresión de la proteína heteróloga fusionada con la Trx, muy superiores incluso a los obtenidos en cloroplastos aisladamente, en ausencia de dicha Trx.

La acumulación, por transformación pastidial, de altos niveles de proteína recombinante puede acarrear la formación de cuerpos de inclusión (Fernández-San Millán *et al.*, 2003). Aunque la formación de cuerpos de inclusión puede suponer por un lado una disminución de la proteólisis en proteínas recombinantes (Enfors, 1992), y puede facilitar la purificación de las mismas; por otro lado requiere un plegamiento *in vitro* que no siempre garantiza la conformación nativa de la proteína, supone una disminución del rendimiento y un encarecimiento del proceso. Estos procedimientos dificultan la producción práctica de proteínas recombinantes para uso terapéutico, diagnóstico u otros. Para solventar estos problemas, se han empleado ciertos péptidos o proteínas fusionados a las proteínas heterólogas. Sin embargo, la iniciación de la traducción es muy sensible a la secuencia nucleotídica que rodea al codón de iniciación de la proteína heteróloga, por esta razón, la fusión puede afectar a los niveles de expresión de dicha proteína.

En bacterias, la fusión de la proteína de interés con la tiorredoxina de *E. coli* (TrxA) ha demostrado ser especialmente útil evitando la formación de cuerpos de inclusión y aumentando la solubilidad de las proteínas heterólogas (LaVallie *et al.*, 1993). Otros trabajos han demostrado que la TrxA bacteriana es capaz de aumentar la solubilidad de proteínas heterólogas mediante coexpresión de ambas (Yuan *et al.*, 2004).

Pese a los esfuerzos realizados en este campo, todavía no se ha descrito ningún método que permita solubilizar cuerpos de inclusión en sistemas de producción de proteínas heterólogas en cloroplastos.

En la presente invención se describe por primera vez la solubilización de los cuerpos de inclusión cuando se coexpresa Trx m con proteínas heterólogas en cloroplastos de tabaco, lo cual garantizaría la conservación de la conformación nativa de la proteína coexpresada y, por tanto, evitaría la pérdida de actividad funcional. El problema técnico resuelto por la invención en este punto es cómo conseguir un plegamiento en forma activa y una solubilización de la proteína heteróloga que no se acumule en cuerpos de inclusión. Esta solución se encuentra recogida en EP1609867 o en WO9837208. Sin embargo estos documentos se refieren a *E. coli* o levaduras como organismos transformados. Ningún documento del estado de la técnica induce al experto en la materia a modificar el vector de fusión descrito en WO0250289 con una construcción como la descrita en EP1609867 o en WO9837208 y utilizarlo como vector de coexpresión en plastidios para obtener proteínas heterólogas en conformación soluble y activa sin que se acumulen en cuerpos de inclusión como hace la invención. De hecho en EP1609867, tanto la fusión como la coexpresión provocan incremento de la solubilidad, mientras que en plastidios, las construcciones de fusión producen proteínas heterólogas que se acumulan en cuerpos de inclusión, lo cual indica que plastidios y bacterias se comportan en este caso de modo diferente como sistemas de expresión. Por otra parte, la construcción descrita en WO9837208 es muy diferente a la de la invención.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere una nueva molécula de ácido nucleico aislada, que codifica la tiorredoxina plastidial, procedente de *Nicotiana tabacum*, (SEQ ID N°:7), y a los polipéptidos producidos a partir de dicha secuencia (SEQ ID N°: 6 y 8), así como a moléculas sustancialmente homologas a las mismas (porcentaje de homología mínimo del 90%) o a sus variantes alélicas.

La invención se refiere también a los vectores de expresión recombinantes que incluyen las moléculas de ADN descritas y a los organismos hospedadores que los incorporan, particularmente plantas.

Un aspecto adicional de la invención describe el método de obtención de las plantas transgénicas citadas, que comprende la integración de uno de los vectores descritos, por cualquier medio apropiado, en el plastoma de una planta.

Otra realización adicional se refiere a la Trx m recombinante (SEQ ID N°:8), obtenida a partir del hospedador correspondiente en forma soluble, activa y con actividad reductora. También se describe el uso de los hospedadores que incorporan dicha Trx, para obtenerla en forma sobreexpresada.

Los citados vectores y hospedadores recombinantes se han utilizado también para la expresión de proteínas heterólogas recombinantes en cloroplastos cuyas secuencias se han fusionado o coexpresado con las de la Trx m. Una realización adicional de la invención se refiere al uso de las plantas transplastómicas que llevan secuencias de proteínas heterólogas fusionadas con las de las Trx m, para la producción de tales proteínas en cantidades mayores. Otra realización de la invención relacionada con este aspecto se refiere a un método de producción de proteínas heterólogas biológicamente activas y/o plegadas en su correcta conformación, a partir de plantas transplastómicas que coexpresan las secuencias de dichas proteínas junto con la de la Trx m.

En algunos casos, la coexpresión ha producido proteínas heterólogas recombinantes con propiedades diferentes. Así, la invención describe una composición farmacéutica que comprende la proteína recombinante hCT1 obtenida a partir de la planta transgénica que incorpora dicha proteína fusionada o coexpresada con la Trx m de la invención. Esta proteína recombinante muestra una mayor bioactividad que la proteína producida en cloroplastos cuando la hCT1 se expresa sola.

Descripción detallada de la invención

La presente invención hace referencia al aislamiento de un fragmento de nucleótidos que codifica una tiorredoxina. Concretamente, la presente invención hace referencia a la secuencia genética de la tiorredoxina plastidial *m* (Trxm) de *Nicotiana tabacum*, su método de clonaje, expresión a diferentes niveles y su aplicación. El gen NtTrxm madura está representado por SEQ ID N°:7, detallada en el listado de secuencias (véase también Fig. 1). También se contemplan moléculas sustancialmente homologas a las mismas (porcentaje de homología mínimo del 90%) o sus variantes alélicas. Sendas realizaciones de la invención se refieren a las secuencias nucleotídicas homologas a Trx *m*. Asimismo, se prefieren las moléculas prácticamente idénticas a las citadas (porcentaje de homología mínimo del 90%). Más preferida aún es la realización correspondiente a la molécula de ADN idéntica a la representada por SEQ ID N°:7.

En sucesivas realizaciones concretas de la invención se describen las secuencias polipeptídicas correspondientes a la proteína precursora de trx *m*, representada por SEQ ID N°:6 o a la trx *m* madura representada por SEQ ID N°:8, incluyéndose en la invención las secuencias prácticamente idénticas o idénticas a las mismas, de forma análoga a las realizaciones descritas para las moléculas de ADN.

La invención proporciona además vectores de expresión que contienen las moléculas de ADN que codifican Trx *m*. La integración en el genoma plastidial se realizó mediante secuencias de recombinación homologa ZRI y ZRD (Fig. 4) por lo que una realización adicional de la invención está constituida por los vectores plastidiales que incluyen dichas secuencias. Se prefieren los vectores plastidiales que incorporan la secuencia de ADN idéntica a SEQ ID N°:7, que lleva fusionada en su extremo 5' la secuencia ATG GGT CAC CAT CAC CAT CAC CAT, correspondiente a metionina, glicina y una cola de 6 histidinas, para facilitar la posterior purificación de la proteína recombinante obtenida.

Para optimizar la síntesis de Trx en cloroplastos es necesario considerar otros elementos. El nivel final de síntesis proteica depende de varios factores como dosis génica, fuerza del promotor, estabilidad del ARNm y eficiencia de la traducción. Por tanto, en el diseño de los vectores de transformación, la expresión de los transgenes en cloroplastos transgénicos puede ser regulada a tres niveles: (a) transcripcionalmente mediante la elección del promotor; (b) post-transcripcionalmente por la elección de la 5'UTR que regula la estabilidad de los ARNm y (c) traduccionalmente, también mediante la elección de la región 5'UTR que dirige el nivel traduccional. Aunque la presencia de la 3'UTR es importante para conferir estabilidad al ARNm, generalmente no hay diferencias traduccionales al cambiar unas regiones 3'UTR por otras. Por ello, no se considera esta región como una variable a modificar en los diferentes vectores. En realizaciones preferidas de la invención se introducen promotores endógenos constitutivos de plastidios para dirigir el gen de interés en la transformación y secuencias inductoras de la traducción (5'UTRs).

Los promotores plastidiales probados para la expresión de proteínas heterólogas hasta el momento han sido varios, pero los mejores niveles de expresión se han obtenido con los promotores *Prn* y *PpsbA*, ambos dos constitutivos. Se sabe que el *PpsbA* es un promotor muy activo, produciendo uno de los ARNms más abundantes en el cloroplasto (Yukawa *et al*, 2007). Los resultados de varios estudios en cuanto a la fuerza de los promotores son ambiguos, decantándose unos hacia el *Prn* y otros hacia el *PpsbA* (Farran *et al*, 2008).

Para la elección de regiones 5'UTR se disponía de varias opciones. Una de las regiones más interesantes era la 5'UTR del gen *psbA* de tabaco, que había sido utilizada originalmente para estudios funcionales con GUS y se sabía que era, entre varias, la que más inducía la traducción en condiciones de luz y confería gran estabilidad a los transcritos (Eibl *et al*, 1999). Se han alcanzado, en plastidios de tabaco, niveles de expresión del 31,1% de proteína soluble total (Molina *et al*, 2004) utilizando dicha 5'UTR. Otro elemento de interés era el sitio de unión al ribosoma (RBS) de la región líder del gen *10* del bacteriófago T7 (G10L). Este RBS es complementario al anti-RBS de la 16SrRNA, que proporciona señales de traducción muy eficientes e independientes de la luz. Además, ya se había comprobado que aumentaba la capacidad de traducción de genes exógenos en *E. coli* (Olins *et al*, 1988) y plastidios (Staub *et al*, 2000), llegando a alcanzar niveles de expresión del 25% de proteína soluble total (Tregoning *et al*, 2003). Como resultado del estudio de los promotores y regiones 5'UTR disponibles, se decidió elegir los siguientes elementos: promotor *Prn* con su propia 5'UTR, promotor *Prn* y RBS del gen *10* del bacteriófago T7 (G10L), y promotor y 5'UTR del gen *psbA*. Por todo ello, son realizaciones preferidas de la invención aquellos vectores que incorporan el inserto unido operativamente al promotor y el 5'UTR del gen *psbA* de *N. tabacum*, concretamente los que incorporan la secuencia SEQ ID N°:7. Asimismo, se prefieren las realizaciones en las que el inserto se une al promotor *Prn* y al RBS de G10L. Concretamente, la que incorpora la secuencia SEQ ID N°:7.

El vector utilizado para la sobreexpresión de Trx mediante transformación plastidial fue el pL3 que ha sido probado para la expresión de cardiotrofina-1 humana, hCT1 (Farran *et al*, 2008). Este vector integra los genes de interés por recombinación homologa dentro de los marcos de lectura abiertos (ORFs) 70 y 131 situados entre los genes *rrn16/trmV* y *rps7/12*, en la zona repetida invertida del genoma plastidial. La inserción en esta zona ya * ha sido usada anteriormente (Maliga, 2004), y permite integrar los genes sin interferir con regiones codificantes y sin consecuencias fenotípicas. La integración de los genes de interés se produce dentro de la región duplicada invertida, por lo que cada plastoma contendrá dos copias de los genes de interés como resultado del proceso de corrección de copia de los plastidios (Maliga, 2004), resultando en un altísimo número de transgenes por célula (hasta 20.000). Consecuentemente, se prefieren las realizaciones de la invención referidas a vectores derivados de pL3. Las construcciones finalmente analizadas para estudiar la sobreexpresión de la Trx *m* en plastidios de tabaco fueron: pL3psbATR Xm, pL3PrnTR Xm y pL3PrnG10LTR Xm (Fig. 2). De ellas, las que proporcionaron mejores resultados para la sobreexpresión de Trx fueron la primera y la última, que corresponden a realizaciones preferidas de la invención.

La presente invención se aplica además a la producción de proteínas heterólogas expresadas en un organismo huésped no nativo. Los vectores de fusión constan de la Trx *m*, sin el codón de terminación de la traducción (TAA), fusionada a la proteína de interés, de forma que ambas se encuentran bajo el control del mismo promotor constitutivo plastidial. Por tanto, las siguientes realizaciones de la invención cubren vectores de fusión de las secuencias precursoras y maduras de las Trx plastidiales (codón de inicio ATG unido a SEQ ID N°:7, sin el codón de terminación TAA) con proteínas heterólogas. En realizaciones preferidas, se ha clonado entre ambas secuencias una secuencia de reconocimiento para una proteinasa que, en otra realización preferida, es la enteroquinasa, con la finalidad de poder separar ambas proteínas tras su purificación. Concretamente, una de las proteínas heterólogas fusionadas fue la albúmina sérica humana (HSA), que corresponde a una realización muy preferida de la invención. Se prefieren aún más las realizaciones en las que el vector es un derivado del plásmido pAF (integra los genes de interés en la región intergénica *trnI-trnA*), y aquéllas en las que la fusión está bajo el control transcripcional del promotor y la 5'UTR del *psbA* (pAFpsbATRXm-EK-HSA). Otra de las proteínas fusionadas fue la cardiotrofina-1 humana (hCT1), constituyendo su correspondiente vector de fusión otra realización de la invención. Son especialmente preferidas aquéllas realizaciones en las que el vector deriva del plásmido pL3, concretamente, el vector pL3psbATRXm-EK-hCT1.

En los vectores de coexpresión las dos proteínas, Trx y proteína heteróloga, se han expresado en forma libre, dirigidas por un promotor diferente con el fin de evitar una posible recombinación entre las secuencias de dichos promotores que supusiera una delección de uno de los transgenes. En realizaciones sucesivas de la invención, se describen los vectores de coexpresión que comprenden la secuencia de Trx (codón de inicio ATG unido a SEQ ID N°:7) unida a un promotor constitutivo endógeno plastidial y a una secuencia inductora de la traducción independientes del promotor y la secuencia inductora de la traducción unidos operativamente a la proteína heteróloga. Las realizaciones preferidas son aquéllas en las que la secuencia correspondiente a la Trx *m* madura está controlada por el promotor Prn y la secuencia RBS G10L, y la proteína heteróloga está controlada por el promotor y la secuencia 5' UTR del gen *psbA* de *N. tabacum*. Los vectores que coexpresan la albúmina sérica humana corresponden a una realización preferida, y se prefiere especialmente la utilización del plásmido pAF, siendo el vector preferido pAFpsbAH-SA::PrnG10LTRXm. La otra proteína coexpresada con Trx fue la hCT1, constituyendo sus vectores de coexpresión otra realización preferida, especialmente aquéllas que incluyen como plásmido el pL3, en concreto el vector más preferido es pL3PrnG10LTRXm::psbAhCT1.

Las siguientes realizaciones de la invención se refieren a organismos hospedadores que incorporan los diferentes vectores plastidiales de expresión, fusión y coexpresión detallados anteriormente. Una realización preferida se refiere a los organismos que incorporan los vectores de expresión plastidiales pL3PrnG10LTRXm ó pL3psbATRXm que son los más eficientes en cuanto a la expresión de Trx *m* recombinante. Dichos hospedadores pueden ser *E. coli*, en una realización, o plantas transgénicas, sus semillas o material de propagación, que incorporan en sus plastidios los vectores recombinantes descritos. En realizaciones preferidas, se describen sucesivamente las plantas transgénicas que incluyen los vectores de expresión, fusión y coexpresión descritos anteriormente, preferiblemente dichas plantas pertenecen a las especies *Nicotiana tabacum* o *Solanum tuberosum*.

Un aspecto adicional de la invención describe métodos de obtención de las nuevas plantas transgénicas descritas, que permiten integrar en su plastoma los vectores recombinantes descritos anteriormente. Un método preferido, incluye las siguientes etapas:

- a) bombardeo de hojas cultivadas *in vitro* con una pistola de genes cargada con uno cualquiera de los vectores de expresión plastidial descritos anteriormente;
- b) obtención de los primeros transformantes regenerados en medio de cultivo suplementado con un antibiótico frente al cual confiera resistencia el vector bombardeado;
- c) realización de, al menos, un segundo ciclo de regeneración en medio selectivo con el mismo antibiótico, para obtener plantas homoplásmicas;
- d) selección de las plantas homoplásmicas mediante cualquier método de selección de ADN por tamaños.

Se prefieren aquellos métodos en los que las hojas proceden de las especies *Nicotiana tabacum* o *Solanum tuberosum* y el antibiótico utilizado es espectinomycin.

La invención describe también los diversos usos y procedimientos en los que se emplearon los hospedadores y, sobre todo, las plantas transgénicas descritas.

Según se observa en los ej. 4, 8 y 9, los vectores plastidiales descritos anteriormente producen la sobreexpresión, tanto de la propia *trx m*, como de las proteínas heterólogas fusionadas o coexpresadas con la misma. Consecuentemente, un aspecto relevante de la invención se refiere a un procedimiento para sobreexpresar la tiorredoxina *m* plastidial recombinante representada mediante SEQ ID N°:8, o proteínas heterólogas fusionadas o coexpresadas con la misma, que comprende las siguientes etapas:

- a) Obtener un vector de expresión plastidial recombinante que comprende el fragmento de ácido nucleico codificante representado por codón de inicio ATG unido a SEQ ID N°:7 y, adicionalmente, secuencias de recombinación

ción homóloga que permiten dirigir la inserción en el genoma plastidial de los fragmentos comprendidos entre ellas, un promotor constitutivo endógeno plastidial y una secuencia inductora de la traducción;

b) Transformar un organismo hospedador bacteriano o una planta con el vector de la etapa a).

5

Una realización adicional de la invención se refiere al procedimiento descrito, aplicado para sobreexpresar tiorredoxina m plastidial recombinante, en el que el vector de la etapa a) es un vector de expresión de *trx m*. Se prefieren especialmente los casos, en los que el hospedador de la etapa b) es la bacteria *E. coli*, o bien la planta transgénica que incorpora los vectores pL3psbATRXm ó pL3PrnG10LTRXm.

10

Debido a las ventajas que supone el aislamiento en forma soluble y activa de la *Trx m* para poder usarla como antioxidante, y a las nuevas propiedades de la *trx* recombinante obtenida de plantas transgénicas, otro aspecto de la invención contempla un producto enzimático constituido por dicha *Trx m* recombinante sobreexpresada en forma soluble, activa y que conserva su actividad reductora.

15

Otro aspecto de la invención radica en el análisis de los efectos producidos en las plantas que incluyen las proteínas HSA o hCT1, fusionadas o coexpresadas en sus cloroplastos con la nueva *Trx m*. En primer lugar, se analizaron las cantidades de HSA acumuladas en hojas de plantas adultas cultivadas en fitotrón, de las que se extrajo la proteína total (Farran *et al*, 2002). Mediante inmunodetección y utilizando como anticuerpo primario un anti-HSA, se comprobó que las plantas que expresaban la HSA fusionada a tiorredoxina m presentaba un patrón de bandas (Fig. 14a, calles 2-4) similar al observado en las muestras de plantas que expresan la HSA sola (Fig. 14a, calle 1; Fernández-San Millán *et al*, 2003). Se puede observar una gran cantidad de agregados de alto peso molecular, lo que podría estar indicando la acumulación en el cloroplasto, de la proteína de fusión en cuerpos de inclusión, tal y como ocurre cuando la HSA se expresa sola (Fernández-San Millán *et al*, 2003). Sin embargo, estos agregados desaparecen cuando la albúmina es co-expresada con *trx m* (ó f) (Fig. 14a, calles 5-7), sugiriendo un posible papel de las *Trx* en la solubilización de los cuerpos de inclusión de HSA. Además, parece que la expresión de la tiorredoxina en forma libre o fusionada tiene diferente modo de acción sobre la solubilidad de las proteínas recombinantes (Yuan *et al*, 2004), lo que explicaría el hecho de que sólo se consiga la disolución de los agregados cuando se coexpresan ambas proteínas. Aunque la formación de cuerpos de inclusión puede suponer por un lado una disminución de la proteólisis en proteínas recombinantes (Enfors, 1992), y puede facilitar la purificación de las mismas, por otro lado requiere un plegamiento *in vitro* que no siempre garantiza la conformación nativa de la proteína, supone una disminución del rendimiento y un encarecimiento del proceso. Por ello, en muchos casos puede resultar interesante disponer de un sistema de solubilización para la expresión de proteínas heterólogas en los cloroplastos.

35

Dada la gran cantidad de proteína recombinante observada en la inmunodetección de las plantas que expresan la fusión de la *Trx m* con la HSA, se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE (Fig. 14b). En los extractos de las hojas que expresan la fusión de la *Trx m* con la HSA, además de la banda correspondiente a la subunidad grande de la RuBisCo (aprox. 50 kDa), se observa una intensa banda teñida con CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) de un tamaño aproximado de 80 kDa (Fig. 14b, calles 1-4). Dicha banda no aparece en los extractos de hoja de las plantas sin transformar (Fig. 14b, PH) ni en los de las plantas que expresan la HSA sola (Fig. 14b, calle 5). En estos últimos sin embargo, se puede visualizar una banda más tenue, de unos 67 kDa, correspondiente a la HSA. Estos resultados indican que se acumula una gran cantidad de proteína de fusión *TrxmHSA* en los cloroplastos de tabaco, incluso a niveles superiores a los máximos obtenidos en las plantas que expresan la HSA sola ($\approx 11\%$ de la proteína total; Fernández-San Millán *et al*, 2003). Se sabe que la subunidad grande de la RuBisCo representa aproximadamente el 50% de la proteína soluble total de la hoja (Whitney *et al*, 1999). Si comparamos la intensidad de la banda de 80 kDa, correspondiente a la proteína de fusión, con la de la subunidad grande de la RuBisCo, podríamos estimar unos niveles de expresión de la *TrxmHSA* entre un 15-20% de la proteína soluble total.

50

También se analizaron las cantidades de hCT1 acumuladas en hojas completamente desarrolladas de plantas adultas cultivadas en fitotrón, de las cuales se extrajo la proteína total (Farran *et al*, 2002). Estudios preliminares sobre la expresión de hCT1 en cloroplastos de tabaco demostraron que la rhCT1 (hCT1 recombinante) se acumulaba a altos niveles ($\approx 3\%$ de la proteína soluble total) en hojas jóvenes, y se conseguía duplicar estos niveles sometiendo a las plantas a 30 horas de luz continua (Farran *et al*, 2008). Mediante inmunodetección y utilizando como anticuerpo primario un monoclonal frente a hCT1, se comprobó que las plantas que expresaban la hCT1 fusionada a tiorredoxina m (*TrxmCT1*) presentaban mayores niveles de rhCT1 que las plantas control (CT1; Farran *et al*, 2008), independientemente de la condición lumínica utilizada (Fig. 15). Por ello, podemos concluir que la fusión de *Trx m* con la hCT1 proporciona una mayor estabilidad a la proteína de interés, que se traduce en una mayor acumulación de la misma incluso en hojas maduras y sin necesidad de someter a las plantas a condiciones de luz continua. Sin embargo, cuando se analizaron las plantas que coexpresan la *Trxm/f* con la hCT1 (*Trxm/f+hCT1*) se vio que los niveles de expresión de hCT1 fueron similares a los obtenidos en las plantas control (Fig. 15). Además, no se observaron incrementos de proteína en condiciones de luz continua (30 h luz), sugiriendo algún efecto de la coexpresión de las *Trx* sobre el estado redox del cloroplasto, que afecta de algún modo a la traducción de la 5' UTR del *psbA*.

65

De acuerdo con los datos obtenidos, una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para sobreexpresar proteínas heterólogas fusionadas con tiorredoxina m recombinante, en el que:

- a) el vector es un vector de fusión en el que al fragmento de ácido nucleico codificante representado por codón de inicio ATG unido SEQ ID N°: 7, se le ha suprimido el codón de terminación de la traducción y se ha fusionado en 3' con la secuencia codificante de una proteína heteróloga, de forma que ambas secuencias codificantes están bajo el control transcripcional del mismo promotor constitutivo plastidial;
- b) el organismo hospedador es una planta transgénica transformada con el vector de la etapa a).

Una realización particular se refiere al procedimiento descrito, en el que:

- a) el vector es un vector de fusión como los descritos anteriormente;
- b) la planta transgénica es la que incorpora dicho vector.

Concretamente, se prefieren aquellas realizaciones relativas a procedimientos para sobreexpresar albúmina sérica humana o cardiotrofina-1 humana.

Otra realización particular se refiere al procedimiento aplicado para sobreexpresar proteínas heterólogas coexpresadas con tiorredoxinas plastidiales m, en el que:

- a) el vector es un vector de coexpresión como los descritos anteriormente;
- b) el organismo hospedador es la planta transgénica que incorpora dicho vector.

Son especialmente preferidas aquellas realizaciones destinadas a sobreexpresar albúmina sérica humana o cardiotrofina-1 humana.

Adicionalmente, se describe el uso de las plantas transgénicas descritas que coexpresan hCT1, para obtener una proteína heteróloga cardiotrofina-1 humana recombinante de bioactividad incrementada respecto a la proteína hCT1 producida en cloroplastos cuando ésta se expresa sola.

La determinación de la actividad diferencial de la hCT1 recombinante obtenida de las plantas transgénicas, respecto a la comercial, se realizó mediante un método que incluía las siguientes etapas:

- a) estimular hepatocitos con cardiotrofina-1 humana recombinante, procedente de la citada planta transgénica y con cardiotrofina-1 humana comercial;
- b) analizar los extractos celulares estimulados con cada tipo de hCT1 con anticuerpos específicos de la forma fosforilada de STAT-3;
- c) comparar los resultados de ambos tipos de extracto, utilizando como control negativo extracto proteico de tabaco sin transformar, y como control positivo hCT1 comercial, sola o añadida al extracto sin transformar.

Para estudiar la funcionalidad de la rhCT1 producida en cloroplastos de tabaco, se estudió su capacidad para inducir la fosforilación del factor de transcripción STAT-3. El ensayo se llevó a cabo en la línea HepG2 de hepatocarcinoma humano. Los extractos de las células estimuladas se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos específicos de la forma fosforilada de STAT-3 (Fig. 16). Como control negativo se utilizó extracto proteico de tabaco sin transformar y como positivo se utilizó hCT1 comercial (PrepoTech) sola o añadida al extracto crudo de tabaco sin transformar (Fig. 16a). Cuando el bioensayo se realizó con la rhCT1 obtenida a partir de las distintas plantas transformadas, se vio que ésta era capaz de inducir la fosforilación de STAT-3 independientemente del extracto de planta utilizado (Fig. 16b). Sin embargo, dicha fosforilación fue mucho más intensa en el caso de las células estimuladas con extracto de plantas que expresaban la CT1 fusionada o coexpresada con cualquiera de las tiorredoxinas cloroplásticas probadas, sugiriendo que las tiorredoxinas pueden jugar un papel importante en mejorar la bioactividad de la rhCT1 producida en cloroplastos de hojas de tabaco.

Dada la elevada actividad de la proteína hCT1 recombinante obtenida a partir de las plantas transgénicas que incluyen los respectivos vectores de coexpresión, un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que incorpora dicha proteína recombinante.

Así mismo, otro aspecto de la invención se refiere a un método de producción de proteínas heterólogas biológicamente activas y/o en su conformación nativa, que comprende:

- a) cultivar las plantas transgénicas que coexpresan la Trx m de la invención y proteínas heterólogas en condiciones apropiadas para su crecimiento;

- b) separar las partes verdes de la planta;
- c) purificar la proteína heteróloga utilizando técnicas de cromatografía de afinidad, de separación por tamaños con un patrón o de intercambio iónico.

En una realización preferida, se describe la aplicación de dicho método para la producción de HSA.

Descripción de las figuras

Fig. 1. *Secuencia nucleotídica de la tiorredoxina m cloroplástica de tabaco* (a). En cursiva, secuencia del precursor o péptido de tránsito; triplete subrayado indica el inicio de la proteína madura. Secuencia proteica de la tiorredoxina m cloroplástica (b) de tabaco: aminoácidos subrayados indican la secuencia proteica correspondiente al precursor o péptido de tránsito; *parada de la traducción.

Fig. 2. *Vectores de sobreexpresión de Trx m en plastidio*. Se describen las zonas del vector que quedan insertadas en el genoma plastidial. En los extremos aparecen las dos zonas de recombinación homóloga que incluye el vector (ZRI y ZRD). Entre las zonas de recombinación homóloga están esquematizados los diferentes transgenes *Trx m* y *aadA* (gen de adenilil-transferasa, para inactivación de antibióticos). En la posición 5' del transgén se muestran los promotores y regiones 5'UTR elegidas. Prn: promotor de la *16SrARN* de tabaco; PpsbA5'UTR: promotor y 5'UTR del gen *psbA* de tabaco; PrnG10L: promotor de la *16SrARN* y región líder del gen *10* del bacteriófago T7. En la región 3' de la *Trx m* se encuentra el terminador Trps16 de la proteína ribosómica 16. En la región 3' del *aadA* se encuentra el terminador TpsbAnt del gen *psbA* de *Nicotiana tabacum*. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

Fig. 3. *Análisis por PCR de la correcta integración de los transgenes en plantas regeneradas tras el bombardeo con pistola de genes*. El ADN genómico se extrajo a partir de plántulas *in vitro*. La PCR se realizó con los primeros L1 y L2 para comprobar la inserción en el genoma plastidial. El fragmento obtenido en caso de integración es de 1.516 pb. Calles: M, Marcador de pesos moleculares; WT, ADN de planta control sin transformar; (a) 1-6, ADN de plantas regeneradas a partir del bombardeo con el vector pL3psbATRXf; (a) 7-10, ADN de plantas regeneradas a partir del bombardeo con el vector pL3PrnG10LTRXf; (b) 1-3, ADN de plantas regeneradas a partir del bombardeo con el vector pL3PrnTRXf.

Fig. 4. *Análisis de la integración de la Trx m en el plastoma y selección de plantas homoplásmicas mediante transferencia de Southern*. Se digirieron 10 µg de ADN genómico obtenido a partir de plántulas *in vitro* con *Bgl*III. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0,7%. Tras su depuración se transfirieron a membrana de nylon y se hibridaron con sondas específicas. Esquema de la zona de inserción de los transgenes en el genoma plastidial con los sitios de restricción *Bgl*III. Las regiones de recombinación homóloga aparecen subrayadas y se indican como ZRD y ZRI. También se muestran los diferentes transgenes que se integran con los vectores de transformación y a su derecha el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del ADN con *Bgl*III. SH: sonda homóloga a las zonas adyacentes a los transgenes insertados en el genoma plastidial. ORF: marcos de lectura abiertos. LOX: secuencia de reconocimiento de la recombinasa CRE del fago P1; rps: proteína ribosómica; tmV: gen del ARN de transferencia de la valina. Fig. 4 (cont) Autorradiografía del Southern. Calles: PH, ADN de una línea Petit Havana sin transformar como control negativo; 1-3, ADN de líneas transgénicas generadas por la transformación con el vector pL3psbATRXm/f; 4-6, pL3PrnTRXm/f; 7-9, pL3PrnG10LTRXm/f.

Fig. 5. *Inmunodetección de proteínas de hojas de plantas transgénicas de tabaco*. Extractos de proteína total se separaron en un gel SDS-PAGE al 13% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. La membrana se hibridó con un anticuerpo monoclonal *anti-poliHistidina* conjugado con peroxidasa. Calles: M, marcador de pesos moleculares en kDa; PH, 2 µl de proteína de planta Petit Havana sin transformar; el resto de calles son proteína de hojas de plantas transformadas con los vectores 1-3, pL3psbATRXf (2 µl/pocillo); 4-7, pL3PrnG10LTRXf (2 µl/pocillo); 8-11, pL3PrnTRXf (5 µl/pocillo).

Fig. 6. *Patrones transcripcionales de las plantas transgénicas observados en transferencia de Northern*. 20 µg de ARN obtenidos a partir de hojas maduras de plantas adultas en maceta se separaron en un gel de formaldehído y se transfirieron a membrana de nylon. Se hibridaron con una sonda específica de la *Trx f*. (a) Se muestra con flechas el tamaño esperado del transcrito en las líneas transgénicas generadas por los distintos vectores. ORF: marcos de lectura abiertos. LOX: secuencia de reconocimiento de la recombinasa CRE del fago P1; rps: proteína ribosómica; trnV: gen del ARN de transferencia de la valina. (b) Autorradiografía resultante de la hibridación con la sonda de la *Trx f*. A la derecha se muestran los tamaños del marcador de pesos moleculares de ARN en kb. (c) Control de carga: ARNr teñido con bromuro de etidio. Calles: PH, ARN de planta Petit Havana sin transformar; el resto son ARNs de plantas transformadas con 1, 2 y 3, pL3psbATRXf; 4 y 5, pL3PrnTRXf; 6 y 7, pL3PrnG10LTRXf.

Fig. 7. *Expresión de Trx recombinante en E. coli*. Se cargaron cantidades iguales de proteína por pocillo en un gel SDS-PAGE al 13% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. (a) La membrana se hibridó con un anticuerpo monoclonal *anti-poliHistidina* conjugado con peroxidasa, y (b) se tiñó con Ponceau S. Calles: M, marcador de pesos moleculares; pL3, vector pL3 vacío como control negativo; el resto de calles son proteína de *E. coli* transformada con los siguientes vectores: 1 y 2, pL3 PrnG10LTRX *m* y *f*; 3 y 4, pL3 psbATRX *m* y *f*; 5 y 6, pL3PrnTRX *f* y *m*. Se indican los pesos moleculares en kDa.

Fig. 8. *Purificación de Trx recombinante en E. coli*. Se cargaron cantidades iguales de cada fracción obtenida en el proceso de purificación en un gel SDS-PAGE al 15% que se tiñó con coomassie brilliant blue (a) o se transfirió a membrana de nitrocelulosa (b). La membrana se hibridó con un anticuerpo monoclonal *anti-poliHistidina* conjugado con peroxidasa. Calles: M, marcador de pesos moleculares; FT, fracción de proteínas no retenida por la columna; W, lavado; E1 a E4, fracciones de 1 ml eluidas. Se indican los pesos moleculares en kDa.

Fig. 9. *Reducción Trx-dependiente de la insulina por acción de ditiotreitól*. Las mezclas incubadas contenían en un volumen final de 600 µl: 0,1M fosfato potásico (pH 7,0), 2 mM EDTA, 0,13 mM insulina bovina y 0,33 mM DTT (ditiotreitól). Símbolos: ●, 5 mM de Trx de *E. coli* comercial, ○, 5 mM de Trx f. Se muestra la absorbancia a 650 nm frente al tiempo en minutos.

Fig. 10. *Clonación de los vectores de fusión y coexpresión de tiorredoxina m y albúmina sérica humana en el plásmido pAF*. (a-b) Casetes de expresión de la fusión de la tiorredoxina m (TRX) a la albúmina sérica humana (HSA) (a) o de coexpresión de la TRX m con la HSA (b) que se inserta en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pAF. 16S/trnI y trnA/23S: zonas de recombinación homóloga; *aadA* gen de resistencia a espectinomicina y estreptomicina; 3'psbA: región 3' no traducida terminadora del gen psbA de tabaco; Prn: promotor del operón 16SrARN; PpsbA5'UTR: promotor y región 5' no traducida del gen psbA de tabaco; PrnG10L: promotor del operón 16SrARN más la secuencia del sitio de unión al ribosoma (rbs) de la región líder del gen 10 del bacteriófago 17 (G10L). EK: Secuencia de reconocimiento para corte con enteroquinasa. EcoRV, HindIII, SmaI, NotI, EcoR1: sitios de corte de enzimas de restricción. Mediante flechas se indica el sentido de la transcripción.

Fig. 11. *Clonación de los vectores de fusión y coexpresión de tiorredoxina m y cardiotrofina-1 humana en el plásmido pL3*. (a-b) Casetes de expresión de la fusión de la tiorredoxina m (TRX) a la cardiotrofina-1 humana (hCT1) (a) o de coexpresión de la TRX m con la hCT1 (b) que se inserta en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pL3. ZRD y ZRI: zonas de recombinación homóloga; *aadA* gen de resistencia a espectinomicina y estreptomicina; TpsbANt: terminador del gen *psbA* de *Nicotiana tabacum*; Trps16: terminador de la proteína ribosómica 16; LOX: secuencia de reconocimiento de la recombinasa CRE; Prn: promotor del operón 16SrARN; PpsbA5'UTR: promotor y región 5' no traducida del gen psbA de tabaco; PrnG10L: promotor del operón 16SrARN más la secuencia del sitio de unión al ribosoma (rbs) de la región líder del gen 10 del bacteriófago 17 (G10L). EK: Secuencia de reconocimiento para corte con enteroquinasa. EcoRV, HindIII, SmaI, NotI, EcoR1: sitios de corte de enzimas de restricción. Mediante flechas se indica el sentido de la transcripción.

Fig. 12. *Análisis de la integración de las fusiones y coexpresiones de Trx con proteínas heterólogas en el plastoma y selección de plantas homoplásmicas mediante transferencia de Southern*. Se digirieron 10 µg de ADN genómico obtenido a partir de plántulas *in vitro* con *Bgl*III (pL3) o *Hind*III (pAF). Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0,7%. Tras su depurinación se transfirieron a membrana de nylon y se hibridaron con sondas homólogas a las zonas adyacentes a los transgenes insertados en el genoma plastidial. (a-d) Autorradiografías del Southern. PH, ADN de una línea Petit Havana sin transformar como control negativo. Resto de calles, ADN de líneas transgénicas generadas por la transformación con el vector pAFTRXm/fHSA (a); pL3TRXm/fCT1 (b); pAFTRXm/f + HSA (c); pL3TRXm/f + CT1 (d). TRXm/f: tiorredoxinas m ó f; HSA: albúmina sérica humana; CT1: cardiotrofina-1.

Fig. 13. *Producción de albúmina humana recombinante en plantas de tabaco*. (a) Inmunodetección de la proteína total extraída a partir de hojas de plantas transgénicas de tabaco. Se ha utilizado un anticuerpo policlonal frente a albúmina sérica humana (HSA). Calles: 1, plantas que expresan la HSA sola (Fernández-San Millán *et al*, 2003); 2-4, plantas que expresan la proteína de fusión Trxm/fHSA; 5-7, plantas que coexpresan las proteínas Trxm/f y HSA; PH, planta no transformada, (b) gel SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue (CBB). Calles: PH, planta no transformada; M, marcador de peso molecular en kDa; 1-2, plantas que expresan la proteína de fusión TrxmHSA; 3-4, plantas que expresan la proteína de fusión TrxfHSA; 5, plantas que expresan la HSA sola (Fernández-San Millán *et al*, 2003). Trx m/f: tiorredoxina m ó f.

Fig. 14. *Análisis de la acumulación de cardiotrofina-1 humana recombinante tras distintos períodos de iluminación*. Inmunodetección de la proteína total extraída a partir de hojas de plantas transgénicas de tabaco. Se ha utilizado un anticuerpo monoclonal frente a cardiotrofina-1 humana recombinante (rhCT1). Se han utilizado hojas maduras cosechadas tras 15 horas de oscuridad o a las 12 y 30 horas de luz continua. Calles: M, marcador de peso molecular (kDa). CT-1: plantas que expresan la cardiotrofina-1 humana sola (Farran *et al*, 2008). OSC: oscuridad; 12L: 12 h de luz continua; 30L: 30 h de luz continua.

Fig. 15. *Ensayo de la actividad de la rhCT1 a través del análisis de la activación de la fosforilación de STAT-3*. Inmunodetección con anticuerpo específico para la forma fosforilada de STAT-3. (a y b) Calles: hCT-1, control positivo de células estimuladas con CT-1 humana comercial; C, control negativo de células sin estimular, (a) Calles: extracto wt, control negativo de células estimuladas con extracto de plantas no transformadas; hCT-1 en extracto wt, control positivo de células estimuladas con extracto de plantas no transformadas al que se le ha añadido CT-1 humana comercial, (b) Calles: CT1, células estimuladas con distintas cantidades de extracto de plantas transformadas con la CT1 sola; Trxm/fCT1, células estimuladas con distintas cantidades de extracto de plantas transformadas con la fusión Trxm/fCT1; Trxm/f+CT1, células estimuladas con distintas cantidades de extracto de plantas transformadas con la CT1 coexpresada con la Trxm/f.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Obtención de las secuencias maduras de la Trx m plastidial

Se obtuvo la secuencia de la Trx madura *m* de *Nicotiana tabacum* aún no descrita, mediante amplificación de sus extremos 5' y 3'. Para ello se utilizó el *Kit RLM-RACE* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante y diseñando cebadores internos a partir de las regiones conservadas en Trx de solanáceas (TxfRACEup, TxfRACEdown, TxmRACEup, TxmRACEdown; Tabla 1). Como molde se utilizó cDNA de tabaco var. Petit Havana. Basándose en las secuencias amplificadas mediante RACE se diseñaron los cebadores NtTrxm-5' y NtTrxm-3' (Tabla 1) para clonar la Trx m madura de tabaco (SEQ ID N° 7; véase también Fig. 1). Estos cebadores incorporan en la región 5' la diana *NcoI* para la fusión con el extremo 3' del promotor correspondiente seguida de una cola de histidinas, y en la región 3' una diana *NotI*.

TABLA 1

Cebadores utilizados en la clonación de la secuencia de la Trx m maduras de tabaco

| Cebadores | Secuencia ¹ | Sitios de reconocimiento de enzimas de restricción |
|------------------------|---|--|
| TxmRACEup | GAGGGGCTTTCATCTGTATTCAG | |
| TxmRACEdown | CTGAATACAGATGAAAGCCCCTC | |
| NtTrxm-5' ² | <u>CCATGGGT</u> CACCATCACCATCACCATGAAGCGCAA | <i>NcoI</i> |
| NtTrxm-3' | <u>GCGGCCGCTT</u> ACAAGAATTTCTCTATGCAGGTGG | <i>NotI</i> |

¹Secuencia del cebador en orientación 5'→3'.

²En cursiva: cola de histidinas.

Ejemplo 2

Obtención de vectores de expresión de tiorredoxinas

pL3psbATRXm: la secuencia madura de la Trx *m* se obtuvo por digestión *NcoI-NotI* de los vectores pGEMTRXm, resultando un fragmento de 366 pb. Estos fragmentos se clonaron en el vector pBS-psbAHSA (Fernández-San Millán *et al*, 2003), digerido con *NcoI-NotI*, para incorporar el promotor y la 5'UTR del gen *psbA* de tabaco. El promotor y la 5'UTR del gen *psbA* junto con la Trx *m* se subclonó, mediante digestión *EcoRI-NotI*, en el vector pPCR2.1 (pPCR2.1psbATRXm). Finalmente, el fragmento *EcoRI-XhoI* de dicho vector se insertó en el vector de transformación plastidial pL3, para obtener así el vector final pL3psbATRXm (véase Fig. 2).

pL3PrmTRXm: el fragmento de 215 pb perteneciente al promotor del operón del RNA ribosomal del plastidio (Prm) se obtuvo del vector pBS-PrmaadA (del Río, resultados no publicados). En este vector se clonó el fragmento *NcoI-NotI* de la Trx *m*. Por digestión *EcoRI-NotI* del vector intermedio obtenido (pBS-KSPrmTRXm) se obtuvo la fusión de la Trx *m* con el promotor del operón rRNA, que se clonó en el vector pPCR2.1 (pPCR2.1PrmTRXm). Finalmente, el fragmento *EcoRI-XhoI* de dicho vector se insertó en el vector de transformación plastidial pL3, para obtener así el vector final pL3PrmTRXm (véase Fig. 2).

pL3PrmG10LTRXm: el fragmento *NcoI-NotI* correspondiente a la secuencia madura de la Trx *m* se introdujo en el vector pBS-PrmG10LCTF (Farran *et al*, 2008). De esta forma se obtuvo el vector pBS-PrmG10LTRXm, que por digestión *EcoRI-SalI* liberó la fusión de la Trx *m* con el fragmento de 150 pb que incluye el promotor constitutivo del operón del RNA ribosomal del plastidio (*Prm*), al que se le ha sustituido la 5'UTR por la secuencia del sitio de unión al ribosoma (RBS) de la región líder del gen *10* del bacteriófago T7 (G10L). Los fragmentos obtenidos se ligaron con el vector pL3 para dar lugar al vector de transformación plastidial pL3PrmG10LTRXm (véase Fig. 2).

Ejemplo 3

Generación de plantas transgénicas

La transformación plastidial se basó en el protocolo de Daniell (1997) con ligeras modificaciones que se comentan a continuación. Se partió de hojas de tabaco *in vitro* obtenidas tras una micropropagación después de la germinación. Una hora antes del bombardeo se cortaron las hojas de tabaco, descartando las apicales y las basales. Se pusieron sobre un papel de filtro estéril en medio RMOP (sales MS, 30 g/l sacarosa, 0,1 mg/l ANA, 1 mg/l BAP, 100 mg/l mio-

inositol, 1 mg/l tiamina y 6 g/l Phytagar pH 5,8) en placas Petri con el envés hacia arriba. Se utilizaron partículas de oro de 0,6 micras a razón de 100 ng de oro y 300 ng de ADN por hoja bombardeada. La presión de ruptura fue de 1.100 psi. Todo el material fungible utilizado fue de Bio-Rad. Tras el bombardeo con la pistola de genes Helios Gene Gun PDS-1000 (Bio-Rad), se mantuvieron las hojas en oscuridad durante 48 h dentro de las placas Petri selladas con parafilm.

Tras este período, se cortaron las hojas en trozos de unos 0,5 cm de lado descartando el nervio central. Los trozos de hoja se pusieron con el envés (parte bombardeada) en contacto con el medio RMOP suplementado con 500 mg/l de espectinomicina en cajas Magenta selladas con parafilm. Los primeros transformantes empezaron a emerger de los trozos de hoja a las 3-4 semanas del bombardeo. Los brotes así obtenidos se dejaron crecer hasta que tuvieron suficiente tamaño para extraer el ADN y comprobar la integración de la Trx y el aadA por PCR. Los cebadores utilizados L1 (5'-GGAAATACAAAAAGGGGG-3') y L2 (5-CCTCGTTCAATTCTTTTCG-3') fueron diseñados para eliminar posibles mutantes resistentes a espectinomicina. El cebador L1 anilla en el *Trps16*, a unas 131 pb del final del mismo, y el cebador L2 anilla en el genoma plastidial, a unas 223 pb tras la ZRD. De esta forma, si se ha producido integración de los genes de interés, el producto esperado debe ser de 1,5 kb (Fig. 3a, calles 4-9 y 3b, calles 1-3). La ausencia del producto de PCR indica que esos regenerantes son mutantes espontáneos capaces de crecer en espectinomicina sin presencia del gen *aadA*. Como se puede observar en la Fig. 3, aparecieron mutantes entre los regenerantes muestreados (calles 1-3 y 10). Una alta incidencia de regenerantes resistentes a espectinomicina como resultado de una mutación en el gen 16S rARN plastidial ha sido demostrada en varias ocasiones.

La obtención de líneas transformadas estables implica el cultivo de los transformantes en presencia de espectinomicina durante el tiempo necesario para que las células se dividan, al menos, entre 16 y 17 veces. Durante este tiempo los plastidios transformados tienen ventaja selectiva sobre los no transformados, aumentando en número gradualmente. Los primeros regenerantes obtenidos suelen ser totalmente verdes pero quiméricos, con sectores transformados y sin transformar debido al enmascaramiento por el tejido transgénico. Por ello es necesario, al menos, un segundo ciclo de regeneración en medio selectivo para obtener plantas homoplásmicas. Así, las hojas de los brotes transformados se cortaron en trozos de unos 3 mm de lado y se sometieron a dos o tres nuevas rondas de regeneración en medio RMOP con 500 mg/l de espectinomicina hasta conseguir la homoplasma. Cuando las nuevas plantas regeneradas estuvieron enraizadas, se procedió al análisis mediante transferencia de Southern. Utilizando una sonda a partir de un fragmento de las zonas de recombinación homóloga (sonda SH, ver Fig. 4a) se puede confirmar una integración específica y estable de los transgenes dentro de las regiones duplicadas invertidas del plastoma y seleccionar las plantas homoplásmicas. El ADN de plantas transformadas digerido con *Bgl*II e hibridado con la sonda SH debe producir fragmentos de 6,7 o 4,9 y 1,8 kb según el vector empleado (ver Fig. 4a). En el caso de que el genoma esté sin transformar debe aparecer un fragmento de 4,5 kb. La presencia de ambos tipos de bandas indica heteroplasma. Como se puede observar en la Fig. 4b, se obtuvieron plantas homoplásmicas en todas las construcciones.

Ejemplo 4

Detección de Trx recombinante en plantas transgénicas de tabaco

En primer lugar se detectó la presencia de Trx recombinante en plantas transgénicas de tabaco mediante inmunodetección con un anticuerpo anti-histidina. Se analizó la proteína total de hojas maduras de las plantas transformadas. Como se aprecia en la Fig. 5, en las plantas transformadas con los vectores pL3psbATRXf y pL3PrnG10LTRXf se detectó una banda de 12 kDa correspondiente a la Trx f, siendo la expresión en las mismas de magnitud comparable. Sin embargo, en las líneas obtenidas con el vector pL3PrnTRXf no se detectó Trx f mediante esta técnica, a pesar de que se cargó en el gel más proteína total que en el resto. Resultados similares se obtuvieron cuando se sobreexpresó la Trx m. Las bandas que aparecen por encima de la Trx f, de aproximadamente 23, 27 y 40 kDa, se corresponden con proteínas endógenas de la planta que reaccionan con el anticuerpo anti-histidina utilizado, ya que dichas bandas aparecen también en el extracto de planta sin transformar (Fig. 5, calle PH).

Los factores que influyen en el rendimiento de una proteína heteróloga pueden ser transcripcionales, como la actividad del promotor; postranscripcionales, como la estabilidad del ARN mensajero o la eficiencia de la traducción; y postraduccionales, como la estabilidad de la proteína. Puesto que, *a priori*, la estabilidad de la proteína debería ser exactamente igual en todas las plantas obtenidas, se realizaron estudios a nivel de ARN mensajero para elucidar las causas de las diferencias de acumulación de Trx f entre líneas transgénicas.

Se extrajo ARN de hojas maduras de las plantas transformadas y se hibridó con una sonda específica de la Trx f. Los niveles de transcritos de Trx variaron entre las distintas líneas transgénicas obtenidas (Fig. 6). Se puede observar cómo la línea transformada con pL3PrnTRXf (calles 4 y 5) tiene similar número de transcritos que la línea transformada con pL3PrnG10LTRXf (calles 6 y 7), lo cual era de esperar, ya que las dos se encuentran bajo el control del mismo promotor *Prn*. Sin embargo, cuando la Trx está dirigida por el promotor del gen *psbA* se produce mayor cantidad de transcrito (calles 1, 2 y 3).

En resumen, los vectores que más eficientemente han expresado Trx en cloroplastos transgénicos de tabaco han sido el pL3psbATRXm/f y pL3PrnG10LTRXm/f (Fig. 5). Se ha comprobado que el promotor del gen *psbA* es muy activo en el plastidio, siendo mucho más fuerte que el *Prn* (Fig. 6). Por otra parte, el RBS de la secuencia líder G10L del bacteriófago T7 es un elemento de gran eficacia en la traducción de la Trx, puesto que presentando menos transcritos de Trx f que el promotor del *psbA*, los niveles de proteína obtenida son similares (Figuras 5 y 6). Así, se obtienen plantas que sobreexpresan Trx m o f a diferentes niveles.

Ejemplo 5

Obtención de Trx recombinante soluble y activa en Escherichia coli

5 Dado que existen grandes similitudes entre la maquinaria de transcripción y traducción de bacterias y plastidios (Brixey *et al.* 1997), se comprobó la funcionalidad de los vectores diseñados para la transformación plastidial en *E. coli*. Dichos vectores se usaron para transformar la cepa TOP 10F' de *E. coli*. Los transformantes se cultivaron en medio LB Broth con 100 mg/l de espectinomicina durante 20 h a 37°C en agitador orbital, y se analizó la producción de Trx recombinante por inmunodetección con anticuerpo anti-histidina (Fig. 8). Todos los vectores produjeron Trx inmunorreactiva, aunque el vector que produjo más Trx en este modelo fue el pL3PrnG10LTRXm/f, lo cual parece deberse a la presencia del RBS del gen 10 del bacteriófago T7, que es capaz de aumentar la traducción de genes exógenos en *E. coli* (Olins *et al.* 1988). De este modo, se seleccionaron las cepas con los vectores pL3PrnG10LTRXm/f para continuar con el proceso de purificación.

15 La purificación de las Trx se llevó a cabo empleando el siguiente procedimiento. Los inóculos se cultivaron en 50 ml de medio TB Broth con 100 mg/l de espectinomicina durante 12 h a 37° y en agitación, para luego diluirlos en 1,5 l del mismo medio y dejarlos a 37°C y agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) alcanzó valores alrededor de 2. En ese momento se centrifugaron los cultivos para recoger las células, que se volvieron a suspender en tampón de sonicación (fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 300 mM, imidazol 25 mM, glicerol al 10%, tritón X-100 al 0,5%, inhibidor de proteasas, pH 7,4) y se guardaron congeladas. Las células se sometieron a ultrasonidos y se centrifugaron a 9000 rpm durante 20 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se filtraron a través de un filtro de 0,45 micras. Los sobrenadantes clarificados se incubaron con la resina Ni-NTA Agarose de Quiagen durante 2 h a 4°C en rotación. Al cabo de ese tiempo se pasó todo el volumen por una columna de purificación y posteriormente se lavó con tampón de lavado cuya composición fue idéntica al tampón de sonicación pero con una concentración de imidazol 45 mM. La proteína se eluyó con el mismo tampón que contenía imidazol 300 mM. Las fracciones que contenían la proteína se sometieron directamente a diálisis para eliminar cualquier traza de imidazol y se guardaron congeladas a -20°C. Las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de purificación se analizaron en un gel SDS-PAGE y por inmunodetección con anticuerpo anti-histidinas (Fig. 9). La concentración de la proteína purificada se cuantificó por Bradford utilizando el ensayo "Bio-Rad Protein Assay", obteniéndose aproximadamente 7 mg/l cultivo.

Para comprobar que las Trx recombinantes producidas en *E. coli* mantenían su actividad oxidorreductasa, se probó su capacidad para catalizar la reducción de los puentes disulfuro de la insulina mediante adición de ditiotreitól (DTT) como agente reductor (Holmgren, 1979) (Fig. 10). A la vista de los datos, se confirmó la actividad oxidorreductasa de las Trx recombinantes.

Ejemplo 6

Obtención de los plásmidos de fusión y coexpresión de las Trx con proteínas de interés

40 Fusión con HSA (pAFpsbATTRXm-EK-HSA): A la secuencia madura de la Trx m se le eliminó el codón TAA de finalización de la traducción mediante PCR, utilizando los cebadores SacII-TRXm-5' y TRXm-SmaI-3' (Tabla 2) sobre el molde pGEMTRXm y se clonó en un pGEMT (pGEMTRXmΔTAA). Para fusionar la Trx m al extremo 5' de la HSA, el fragmento SacII-SmaI del vector pGEMTRXmΔTAA se introdujo en el vector pGEM-GPGP-EK-HSA (Del Río, resultados no publicados) digerido con dichas enzimas. Este vector intermedio pGEM-TRXm-EK-HSA se abrió con la enzima HindIII y se ligó con el fragmento HindIII correspondiente al promotor, la 5'UTR del gen psbA y el inicio de la TRX m obtenido del vector pBS-psbATTRXm (descrito anteriormente). El fragmento EcoRV-NotI de este vector (pGEMpsbATTRXm-EK-HSA) se introdujo en el vector pAF para dar lugar al vector pAFpsbATTRXm-EK-HSA (Fig. 11a).

50 Coexpresión con HSA (pAFpsbAHSA::PrnG10LTRXm): Mediante digestión EcoRI-SacI del vector pBS-PrnG10LTRXm se obtuvo un fragmento con el promotor PrnG10L y la Trx m, que se introdujo en el vector pPCR2.1. Este vector intermedio pPCR2.1PrnG10LTRXm se digirió con NotI para introducir la fusión en el vector pLDpsbAHSA (Fernández-San Millán *et al.* 2003), dando lugar al vector pAFpsbAHSA::PrnG10LTRXm (Fig. 11c).

55 Fusión con CT1 (pL3psbATTRXm-EK-CT1): Mediante digestión HindIII del vector PCR2.1 psbATTRXm se obtuvo el fragmento con el promotor, la 5'UTR del gen psbA y el inicio de la Trx m, que se introdujo en el pGEMTRXmΔTAA para dar lugar al pGEMpsbATTRXmΔTAA. El sitio de reconocimiento para corte por enteroquinasa se obtuvo mediante digestión SmaI-SacII del vector pGEMCTB-link (Farran, resultados no publicados), y se introdujo en el extremo 3' de la Trx m del vector pGEMpsbATTRXmΔTAA, dando lugar al vector pGEMpsbATTRXm-EK. La secuencia madura de la hCT1 se obtuvo por digestión XbaI-NotI del vector pGEMCT1 (Farran *et al.* 2008), y se introdujo en el vector anterior para dar lugar al vector pGEMpsbATTRXm-EK-CT1. Por restricción EcoRI de este último vector se extrajo el fragmento completo de fusión de la Trx m a la hCT1 y se introdujo en el vector pL3 para dar lugar al vector pL3psbATTRXm-EK-CT1 (Fig. 12a).

65 Coexpresión con CT1 (pL3PrnG10LTRXm::psbACT1): El fragmento correspondiente al promotor PrnG10L y la Trx m se obtuvo por digestión EcoRI-SacI del vector pBS-PrnG10LTRXm, y se introdujo en el vector pPCR2.1 (pPCR2.1PrnG10LTRXm). El fragmento NotI de este vector se clonó en el vector pL3psbACT1 (Farran

et al., 2008) que expresa la hCT1 bajo el promotor y la 5'UTR del gen *psbA*, para finalmente obtener el vector pL3PrnG10LTRXm::psbACT1 (Fig. 12c).

TABLA 2

Cebadores utilizados en la clonación de los vectores de expresión plastidial

| Cebador | Secuencia ¹ | Sitios de reconocimiento de enzimas de restricción |
|---------|----------------------------------|--|
| SacII- | | |
| TRXm-5' | <u>CCGCGGAAGCTTAAATTCTTCAAGC</u> | SacII |
| TRXm- | <u>CCCGGGCAAGAATTTCTCTATGCAG</u> | |
| SmaI-3' | G | SmaI |

¹Secuencia del cebador en orientación 5'→3'.

Ejemplo 7

Transformación de tabaco con plásmidos de fusión y coexpresión mediante bombardeo, y selección de las plantas transgénicas

La transformación plastidial se basó en el protocolo de Daniell (1997) descrito anteriormente. Partiendo de las plántulas *in vitro* obtenidas tras 2 o 3 ciclos de regeneración, se realizó una primera selección de clones transgénicos por PCR con los cebadores L1 y L2 en el caso de haber usado pL3 como vector de transformación y F1 (5'-AAAACCCGTCCTCAGTTCGGATTGC-3') y F2 (5'-CCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACG-3') para el caso de haber usado pAF (resultados no mostrados). Se extrajo ADN genómico y se utilizó como molde 1 µg de ADN en una PCR de 30 ciclos. Finalmente, se seleccionaron plantas homoplásmicas de todas las construcciones mediante transferencia de Southern (Fig. 13). En la Tabla 3 aparecen los distintos fragmentos generados por digestión *Bgl*III (en el caso de los vectores pL3) o *Hind*III (para los vectores pAF), y que hibridarán con cada una de las sondas utilizadas en la transferencia de Southern.

TABLA 3

Tamaño de los fragmentos generados en la transferencia de Southern, que hibridarán con las sondas homologas a las zonas de recombinación

| Plantas transformadas con el vector | Digestión del ADN genómico | Tamaño de bandas (kb) | Tamaño de hibridadas |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| Control PH | <i>Hind</i> III | | 7.7 |
| pAFpsbATRXm/f-EK-HSA | <i>Hind</i> III | | 8.2 + 3.3 |
| pAFpsbAHSA::PrnG10LTRXm/f | <i>Hind</i> III | | 10.2 + 1.5 |
| Control PH | <i>Bgl</i> II | | 4.5 |
| pL3psbATRXm/f-EK-CT1 | <i>Bgl</i> II | | 4.9 + 2.5 |
| pL3psbACT1::PrnG10LTRXm/f | <i>Bgl</i> II | | 5.5 + 2.1 |

Ejemplo 8

Efecto de la fusión de la Trx m ó f con proteínas heterólogas

En primer lugar se analizaron las cantidades de HSA acumuladas en hojas de plantas adultas cultivadas en fitotrón, de las que se extrajo la proteína total (Farran *et al.*, 2002). Mediante inmunodetección y utilizando como anticuerpo primario un anti-HSA, se comprobó que las plantas que expresaban la HSA fusionada a cualquiera de las dos tiorredoxinas presentaba un patrón de bandas (Fig. 14a, calles 2-4) similar al observado en la muestras de plantas que expresan la HSA sola (Fig. 14a, calle 1). Se puede observar una gran cantidad de agregados de alto peso molecular,

lo que podría estar indicando la acumulación, en el cloroplasto, de la proteína de fusión en cuerpos de inclusión, tal y como ocurre cuando la HSA se expresa sola (Fernández-San Millán *et al.*, 2003). Dada la gran cantidad de proteína recombinante observada en la inmunodetección de las plantas que expresan la fusión de las Trx's con la HSA, se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE (Fig. 14b). En los extractos de las hojas que expresan la fusión de las Trx's con la HSA, además de la banda correspondiente a la subunidad grande de la RuBisCo (aprox. 50 kDa), se observa una intensa banda teñida con CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) de un tamaño aproximado de 80 kDa (Fig. 14b, calles 1-4). Dicha banda no aparece en los extractos de hoja de las plantas sin transformar (Fig. 14b, PH) ni en el de las plantas que expresan la HSA sola (Fig. 14b, calle 5). En estas últimas sin embargo, se puede visualizar una banda más tenue, de unos 67 kDa, correspondiente a la HSA. Estos resultados indican que se acumula una gran cantidad de proteína de fusión TrxHSA en los cloroplastos de tabaco, incluso a niveles superiores a los máximos obtenidos en las plantas que expresan la HSA sola ($\approx 11\%$ de la proteína total; Fernández-San Millán *et al.*, 2003). Se sabe que la subunidad grande de la RuBisCo representa aproximadamente el 50% de la proteína soluble total de la hoja (Whitney *et al.*, 1999). Si comparamos la intensidad de la banda de 80 kDa, correspondiente a la proteína de fusión TrxHSA, con la de la subunidad grande de la RuBisCo, podríamos estimar unos niveles de expresión de la Trxm/fHSA entre un 15-20% de la proteína soluble total.

Algo similar ocurre cuando analizamos la fusión de las Trx con la cardiotrofina-1 humana. Estudios preliminares sobre la expresión de hCT1 en cloroplastos de tabaco demostraron que la rhCT1 se acumulaba a altos niveles ($\approx 3\%$ de la proteína soluble total) en hojas jóvenes, y se conseguía duplicar estos niveles sometiendo a las plantas a 32 horas de luz continua (Farran *et al.*, 2008). Mediante inmunodetección y utilizando como anticuerpo primario un monoclonal frente a hCT1, se comprobó que las plantas que expresaban la hCT1 fusionada a cualquiera de las dos tiorredoxinas (Trxm/fCT1) presentaba mayores niveles de rhCT1 que las plantas control (CT1), independientemente de la condición lumínica utilizada (Fig. 15).

Por lo que podemos concluir que la fusión de cualquiera de las Trx con una proteína heteróloga cualquiera, proporciona una mayor estabilidad a la proteína de interés, que se traduce en una mayor acumulación de la misma incluso en hojas maduras y sin necesidad de someter a las plantas a condiciones de luz continua.

Ejemplo 9

Efecto de la coexpresión de las Trx *m* ó *f* con albúmina sérica humana

Los agregados que forman la HSA sola (Fernández-San Millán *et al.*, 2003) o fusionada a Trx (ejemplo 8) expresadas en cloroplastos de tabaco, desaparecen cuando la albúmina es co-expresada con alguna de las tiorredoxinas (Fig. 14a, calles 5-7), sugiriendo un posible papel de las Trx en la solubilización de los cuerpos de inclusión de HSA. Resultados similares han sido descritos por otros autores utilizando la TrxA bacteriana y en sistemas de expresión unicelulares (Yuan *et al.*, 2004). Además, parece que la expresión de la tiorredoxina en forma libre o fusionada tiene diferente modo de acción sobre la solubilidad de las proteínas recombinantes, lo que explicaría el hecho de que sólo se consiga la disolución de los agregados cuando se coexpresan ambas proteínas. Aunque la formación de cuerpos de inclusión puede suponer por un lado una disminución de la proteólisis en proteínas recombinantes (Enfors, 1992), y puede facilitar la purificación de las mismas; por otro lado requiere un repliegamiento *in vitro* que no siempre garantiza la conformación nativa de la proteína, supone una disminución del rendimiento y un encarecimiento del proceso. Por lo que en muchos casos puede resultar interesante disponer de un sistema de solubilización para la expresión de proteínas heterólogas en los cloroplastos de cualquier organismo fotosintético.

Ejemplo 10

Bioactividad de la cardiotrofina-1 humana recombinante obtenida con la fusión o coexpresión de las Trx

Para estudiar la funcionalidad de la rhCT1 producida en cloroplastos de tabaco, se estudió su capacidad para inducir la fosforilación del factor de transcripción STAT-3. El ensayo se llevó a cabo en la línea HepG2 de hepatocarcinoma humano. Los extractos de las células estimuladas se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos específicos de la forma fosforilada de STAT-3 (Figura 16). Como control negativo se utilizó extracto proteico de tabaco sin transformar y como positivo se utilizó hCT1 comercial (PreproTech) sola o añadida al extracto crudo de tabaco sin transformar (Fig. 16a). Cuando el bioensayo se realizó con la rhCT1 obtenida a partir de las distintas plantas transformadas, se vio que ésta era capaz de inducir la fosforilación de STAT-3 independientemente del extracto de planta utilizado (Fig. 16b). Sin embargo, dicha fosforilación fue mucho más intensa en el caso de las células estimuladas con extracto de plantas que expresaban la CT1 fusionada o coexpresada con cualquiera de las tiorredoxinas cloroplásticas probadas, sugiriendo que las tiorredoxinas pueden jugar un papel importante en mejorar la bioactividad de la rhCT1 producida en cloroplastos de hojas de tabaco.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una tiorredoxina, seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia SEQ ID N°:7;
- b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, al menos en un 90%, a la secuencia, SEQ ID N°: 6 o SEQ ID N°:8.

2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende la secuencia SEQ ID N°: 7.

3. Polipéptido purificado, codificado por una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, cuya secuencia comprende una secuencia idéntica, al menos en un 90%, a SEQ ID N°:6 o SEQ ID N°: 8.

4. Polipéptido según la reivindicación 3, que comprende la secuencia SEQ ID N°: 6.

5. Polipéptido según la reivindicación 3, que comprende la secuencia SEQ ID N°: 8.

6. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

7. Vector de expresión según la reivindicación 6, que comprende adicionalmente secuencias de recombinación homóloga que permiten dirigir la inserción en el genoma plastidial de los fragmentos de ADN comprendidos entre ellas.

8. Vector de expresión según la reivindicación 7, que comprende el fragmento de ácido nucleico codificante representado por codón de inicio ATG unido a SEQ ID N°:7.

9. Vector de expresión según la reivindicación 8, en el que el fragmento de ácido nucleico codificante está unido operativamente a un promotor constitutivo endógeno plastidial y a una secuencia inductora de la traducción.

10. Vector de expresión según la reivindicación 9, en el que el fragmento de ácido nucleico codificante está unido operativamente a la secuencia promotora y a la secuencia 5'UTR del gen psbA plastidial de *Nicotiana tabacum*.

11. Vector de expresión según la reivindicación 9, en el que el fragmento de ácido nucleico codificante está unido operativamente al promotor *Prrn* y a la secuencia del sitio de unión al ribosoma (RBS) de la región líder del gen 10 del bacteriófago T7 (G10L).

12. Vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, que es un derivado del plásmido pL3.

13. Vector de expresión según la reivindicación 12, que es el plásmido pL3psbATRXm.

14. Vector de expresión según la reivindicación 12, que es el plásmido pL3PrmG10LTRXm.

15. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en el que al fragmento de ácido nucleico codificante representado por SEQ ID N°:7, se le ha suprimido el codón de terminación de la traducción y se ha fusionado en 3' con la secuencia codificante de una proteína heteróloga, de forma que ambas secuencias codificantes están bajo el control transcripcional del mismo promotor constitutivo plastidial.

16. Vector según la reivindicación 15, que comprende adicionalmente una secuencia de reconocimiento de una proteinasa entre el fragmento de ácido nucleico codificante representado por SEQ ID N°:7, y la secuencia codificante de la proteína heteróloga.

17. Vector según la reivindicación 16, en el que la proteinasa es la enteroquinasa.

18. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en el que la secuencia codificante adicional codifica la albúmina sérica humana (HSA).

19. Vector según la reivindicación 18, que es un derivado del plásmido pAF.

20. Vector según la reivindicación 19, que es el plásmido pAFpsbATRXm-EK-HSA.

21. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en el que la secuencia codificante de la proteína heteróloga codifica la cardiotrofina-1 humana (hCT1).

22. Vector según la reivindicación 21, que es un derivado del plásmido pL3.

ES 2 354 537 A1

23. Vector según la reivindicación 22, que es el plásmido pL3psbATRXm-EK-hCT1.

24. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, que comprende la secuencia codificante de una proteína heteróloga adicional unida operativamente a un promotor constitutivo endógeno plastidial y a una secuencia inductora de la traducción, independientes del promotor y la secuencia inductora de la traducción unidos operativamente a un fragmento representado por codón de inicio ATG unido a SEQ ID N°:7.

25. Vector según la reivindicación 24, que comprende el codón de inicio ATG unido SEQ ID N° 7 que está unida operativamente al promotor *Prrn* y a la secuencia del sitio de unión al ribosoma (RBS) de la región líder del gen 10 del bacteriófago T7 (G10L), y una secuencia codificante de una proteína heteróloga, unida operativamente al promotor *PpsbA* de *N. tabacum*.

26. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, en el que la secuencia codificante de la proteína heteróloga codifica la albúmina sérica humana (HSA).

27. Vector según la reivindicación 26, que es un derivado del plásmido pAF.

28. Vector según la reivindicación 27 que es el plásmido pAFpsbAHSA::PrrnG10LTRXm.

29. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, en el que la secuencia de la proteína heteróloga codifica cardiotrofina-1 humana (hCT1).

30. Vector según la reivindicación 29, que es un derivado del plásmido pL3.

31. Vector según la reivindicación 30, que es el plásmido pL3PrrnG10LTRXm::psbAhCT1.

32. Un organismo hospedador transformado con un vector plastidial según una cualquiera de las reivindicaciones 7-31.

33. Organismo hospedador según la reivindicación 32, siendo dicho organismo la bacteria *E. coli*.

34. Organismo hospedador según la reivindicación 33, en el que el vector es el descrito en las reivindicaciones 13 ó 14.

35. Organismo hospedador según la reivindicación 32, que consiste en una planta transgénica, sus semillas o material de propagación, **caracterizada** por que su genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores según una cualquiera de las reivindicaciones 7-31.

36. Planta transgénica según la reivindicación 35, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 7-14.

37. Planta transgénica según la reivindicación 36, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14.

38. Planta transgénica según la reivindicación 35, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23.

39. Planta transgénica según la reivindicación 38, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.

40. Planta transgénica según la reivindicación 38, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23.

41. Planta transgénica según la reivindicación 35, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 31.

42. Planta transgénica según la reivindicación 41, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28.

43. Planta transgénica según la reivindicación 41, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homologa de los vectores de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31.

44. Planta transgénica según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 43, perteneciente a las especies *Nicotiana tabacum* o *Solanum tuberosum*.

45. Método de obtención de las plantas transgénicas de las reivindicaciones 35 a 44, que comprende la integración de un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7-31, por cualquier medio apropiado, en el plastoma de una planta.

46. Método según la reivindicación 45, que comprende las siguientes etapas:

- a) bombardeo de hojas cultivadas *in vitro* con una pistola de genes cargada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 31;
- b) obtención de los primeros transformantes regenerados en medio de cultivo suplementado con un antibiótico frente al cual confiera resistencia el vector bombardeado;
- c) realización de, al menos, un segundo ciclo de regeneración en medio selectivo con el mismo antibiótico, para obtener plantas homoplásmicas;
- d) selección de las plantas homoplásmicas mediante cualquier método de selección de ADN por tamaños.

47. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 45 ó 46, en el que, las hojas proceden de las especies *Nicotiana tabacum* o *Solanum tuberosum* y el antibiótico utilizado es espectinomicina.

48. Procedimiento para sobreexpresar la tiorredoxina m plastidial recombinante representada mediante SEQ ID N°:8, o proteínas heterólogas fusionadas o coexpresadas con la misma, que comprende las siguientes etapas:

- a) Obtener un vector de expresión plastidial recombinante que comprende el fragmento de ácido nucleico codificante representado por codón de inicio ATG unido a SEQ ID N°:7 y, adicionalmente, secuencias de recombinación homologa que permiten dirigir la inserción en el genoma plastidial de los fragmentos comprendidos entre ellas, un promotor constitutivo endógeno plastidial y una secuencia inductora de la traducción;
- b) Transformar un organismo hospedador bacteriano o una planta con el vector de la etapa a).

49. Procedimiento según la reivindicación 48, para sobreexpresar tiorredoxina m plastidial recombinante, en el que el vector de la etapa a) es el vector de expresión descrito en las reivindicaciones 8-14.

50. Procedimiento según la reivindicación 49, en el que el hospedador de la etapa b) es la bacteria *E. coli* descrita en la reivindicación 34.

51. Procedimiento según la reivindicación 49, en el que el hospedador de la etapa b) es la planta transgénica de la reivindicación 37.

52. Producto enzimático recombinante cuya secuencia está representada por SEQ ID N°:8, obtenido a partir del hospedador de una cualquiera de las reivindicaciones 34 ó 37, **caracterizado** por que se obtiene en forma soluble y activa y tiene actividad reductora.

53. Procedimiento según la reivindicación 48, para sobreexpresar proteínas heterólogas fusionadas con tiorredoxina m recombinante, en el que:

- a) el vector es un vector de fusión en el que al fragmento de ácido nucleico codificante representado por codón de inicio ATG unido SEQ ID N°: 7, se le ha suprimido el codón de terminación de la traducción y se ha fusionado en 3' con la secuencia codificante de una proteína heteróloga, de forma que ambas secuencias codificantes están bajo el control transcripcional del mismo promotor constitutivo plastidial;
- b) el organismo hospedador es una planta transgénica transformada con el vector de la etapa a).

54. Procedimiento según la reivindicación 53, en el que:

- a) el vector es el que se describe en las reivindicaciones 15-23;
- b) la planta transgénica es la que se describe en las reivindicaciones 38-40.

55. Procedimiento según la reivindicación 54, para sobreexpresar albúmina sérica humana o cardiotrofina-1 humana, en el que la planta transgénica es la que se describe en las reivindicaciones 39 ó 40.

56. Procedimiento según la reivindicación 48, para sobreexpresar proteínas heterólogas coexpresadas con tiorredoxinas plastidiales m, en el que:

- a) el vector es el que se describe en las reivindicaciones 24-31;
- b) el organismo hospedador es la planta transgénica de las reivindicaciones 41-43.

57. Procedimiento según la reivindicación 56, para sobreexpresar albúmina sérica humana o cardiotrofina-1 humana, en el que la planta transgénica es la que se describe en las reivindicaciones 42 ó 43.

ES 2 354 537 A1

58. Uso de la planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 40 ó 43, para la producción de proteína cardiotrofina-1 humana recombinante de bioactividad incrementada en al menos el doble respecto a la proteína cardiotrofina-1 humana expresada sola en cloroplastos.

5 59. Composición farmacéutica que comprende la proteína recombinante obtenida a partir de la planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 40 ó 43, junto con un adyuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 60. Método de producción de proteínas heterólogas biológicamente activas y/o en su conformación nativa, que comprende:

a) cultivar las plantas transgénicas de una cualquiera de las reivindicaciones 41-43 en condiciones apropiadas para su crecimiento;

15 b) separar las partes verdes de la planta;

c) purificar la proteína heteróloga utilizando técnicas de cromatografía de afinidad, de separación por tamaños con un patrón o de intercambio iónico.

20 61. Método según la reivindicación 60, en el que la planta transgénica es la de la reivindicación 42, para producir albúmina sérica humana recombinante en forma soluble y conformación nativa.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(a) Nt-Trxm

```

1 CCTTCGGCAC TGCCGTCGTC GTCACTGGCT CCGGTAGCCG GTTCTTCCTT CTCAAGTCCT
61 CGTTCCTCCG TTAGATTCTC TCAATTCAGA GGCCTTAAGA TCCAGTCAAC TCGCTCATCC
121 GTCTCCACTA CCTCATGCTC AAAAATCATT CCCGGACGAG CTCGAATCGT CTGCGAAGCG
181 CAAAATACTG CCCTTGAAGT GGGTGCTGTT AATGATAAAA CATGGAAGTC ACTTGTTGTA
241 GAGTCTGATA TACCTGTCCT GGTGAATTT TGGGCTCCGT GGTGTGGTCC ATGCCGAATG
301 ATCCACCCGG TCATTGATGA ACTGGCAAAG GAATATGCTG GCAAGCTTAA ATTCTTCAAG
361 CTGAACACGG ACGAAAGCCC TTCCACAGCA ACCGAATTGG GGATTCTGAAG CATCCCAACT
421 GTGATGATTT TCAAGAATGG AGAGAAGAAA GATGCAGTCA TTGGTGCAGT TCCTAAATCA
481 AACTAACCA CCTGCATAGA GAAATTCTTG TAA

```

(b) Nt-Trxm (aa)

```

1 PSALPSSSLA PVAGSSFSSP RSSVRFSQFR GLKIQSTRSS VSTTSCSKII PGRARIVCEA
61 QNTALEVGAV NDKTWKSLVV ESDIPVLVEF WAPWCGPCRM IHPVIDELAK EYAGKLKFFK
121 LNTDESPSTA TELGIRSIPT VMIFKNGEKK DAVIGAVPKS TLTTCTIEKFL *

```

FIG. 1

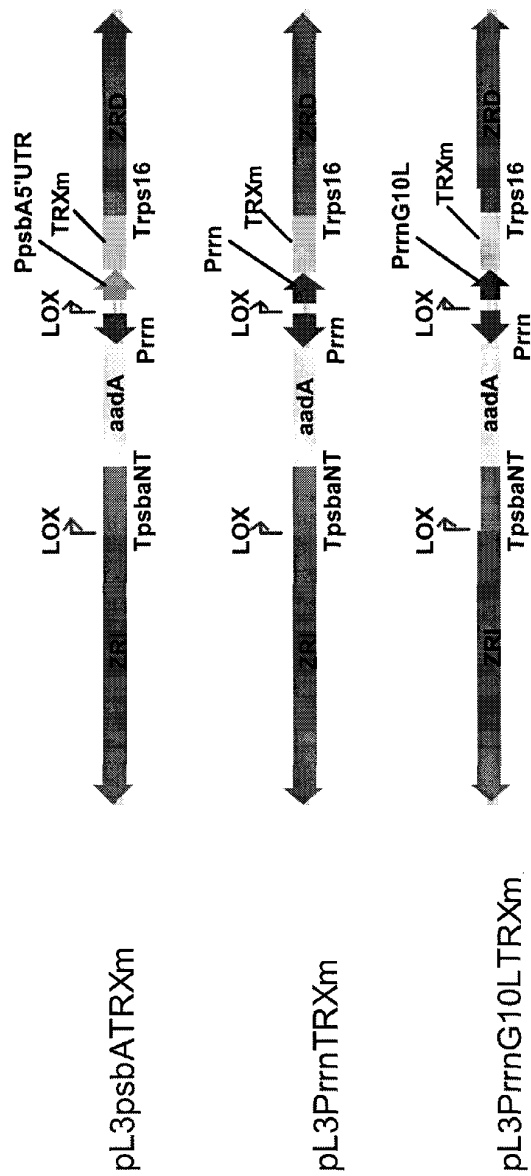


FIG.2

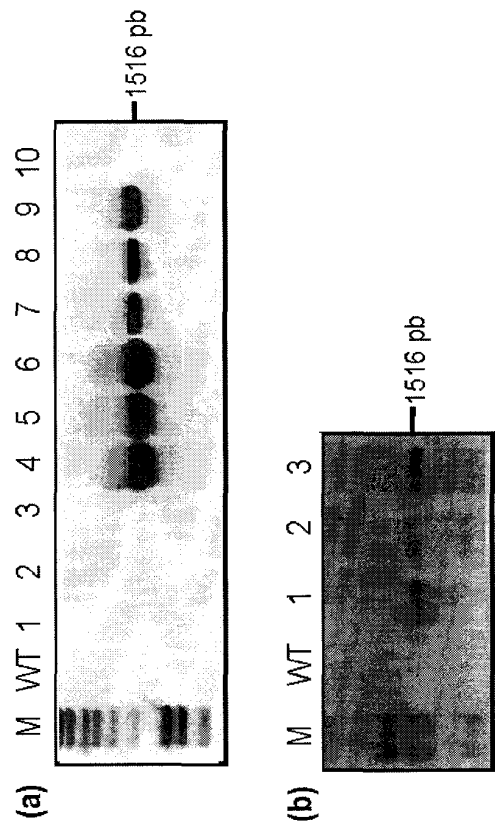


FIG.3

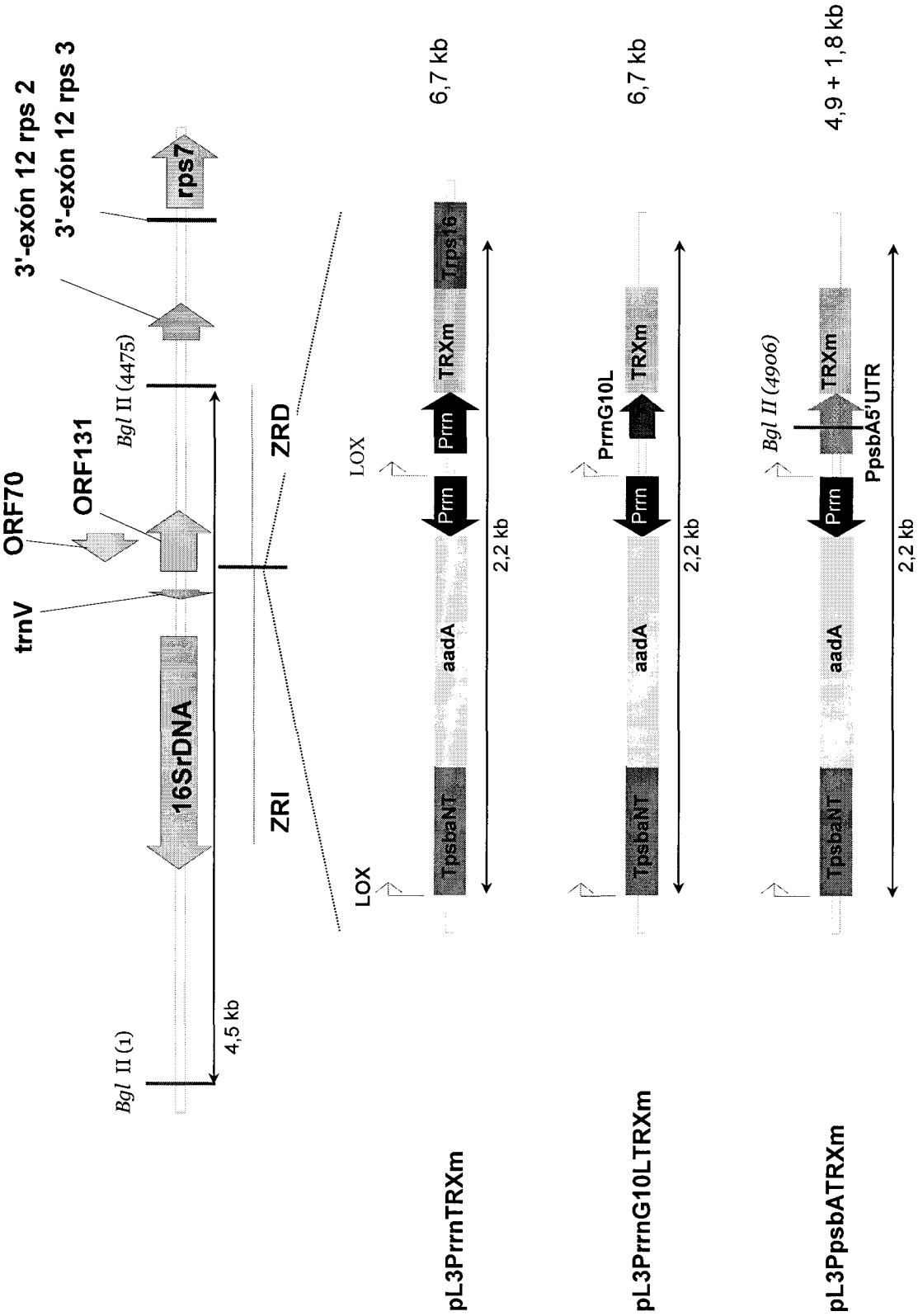


FIG.4

(b)

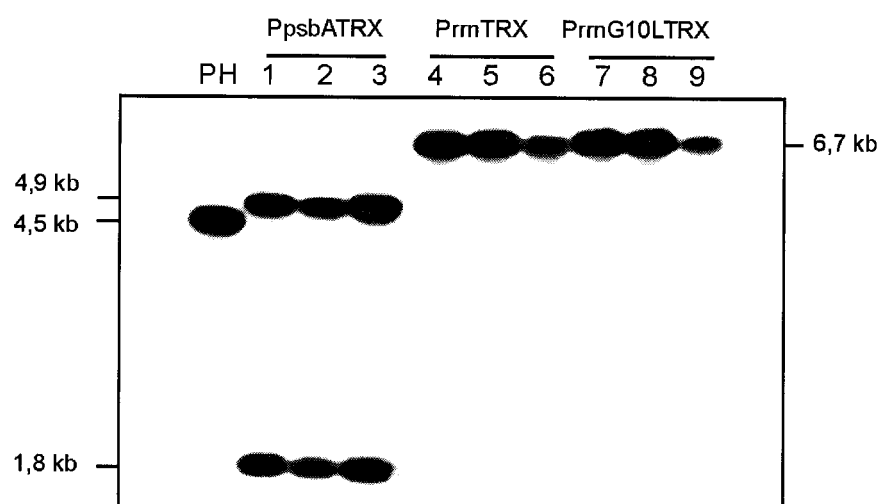


FIG.4 (CONT.)

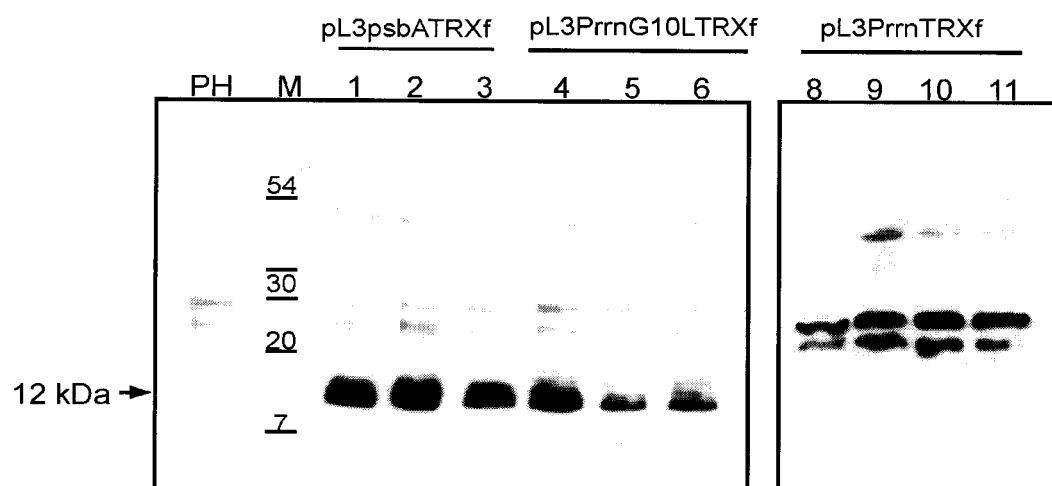


FIG. 5

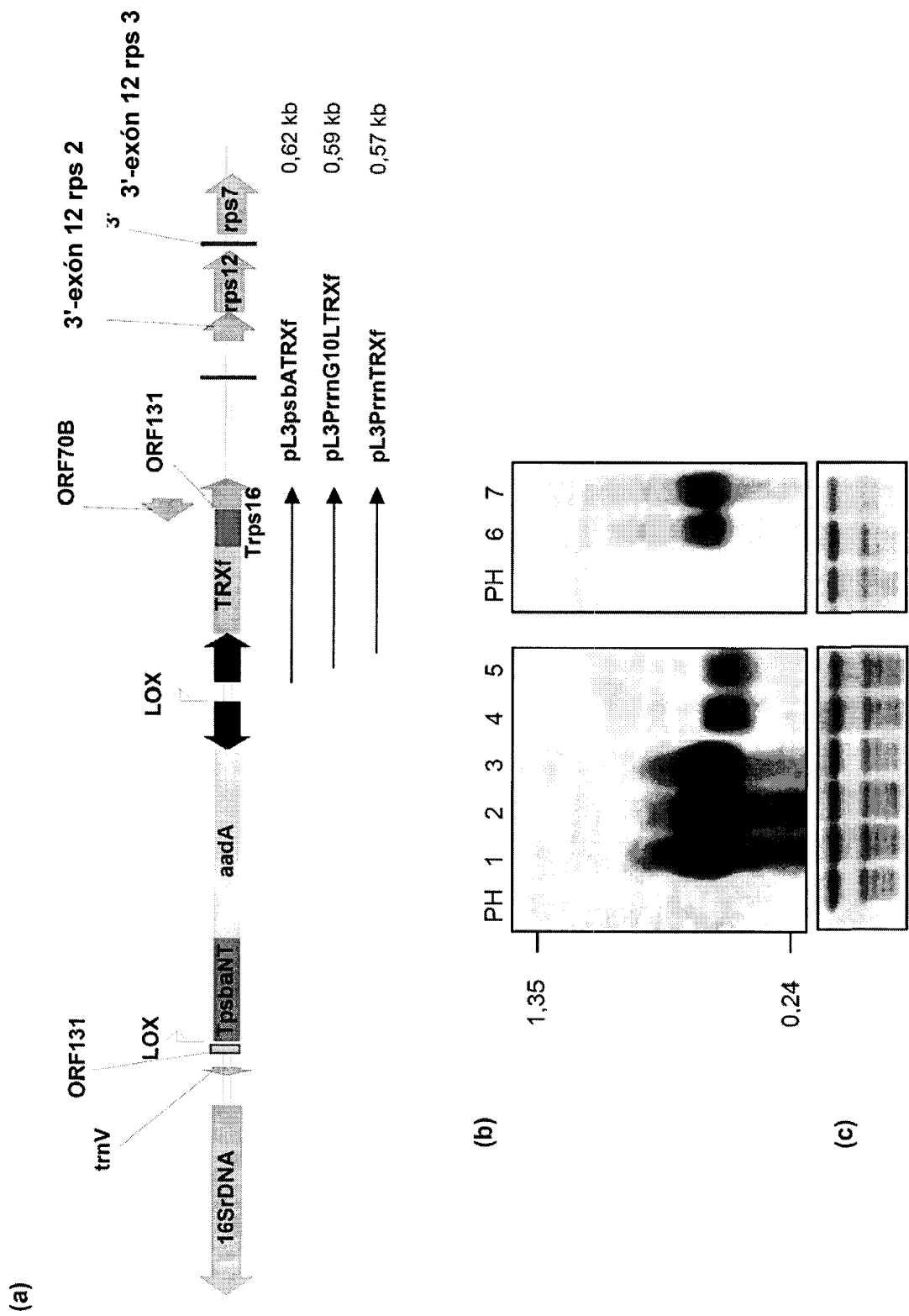


FIG.6

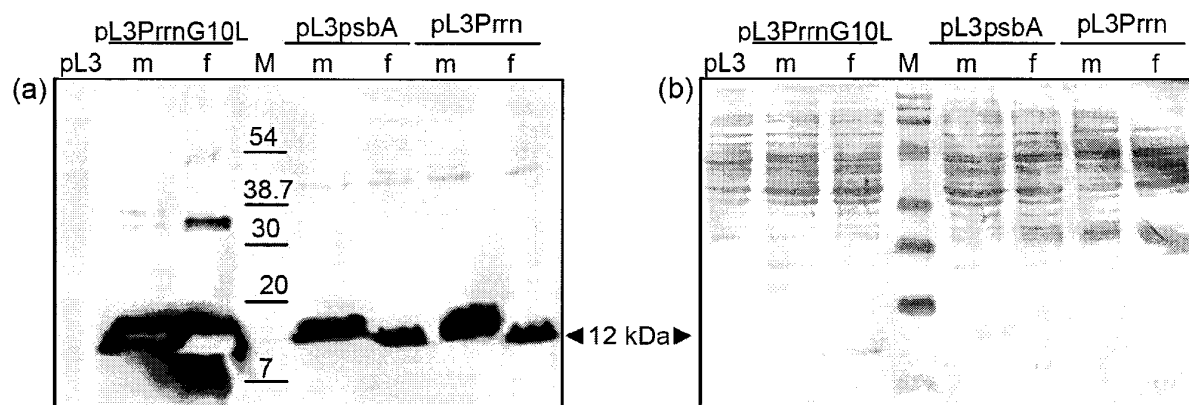


FIG. 7

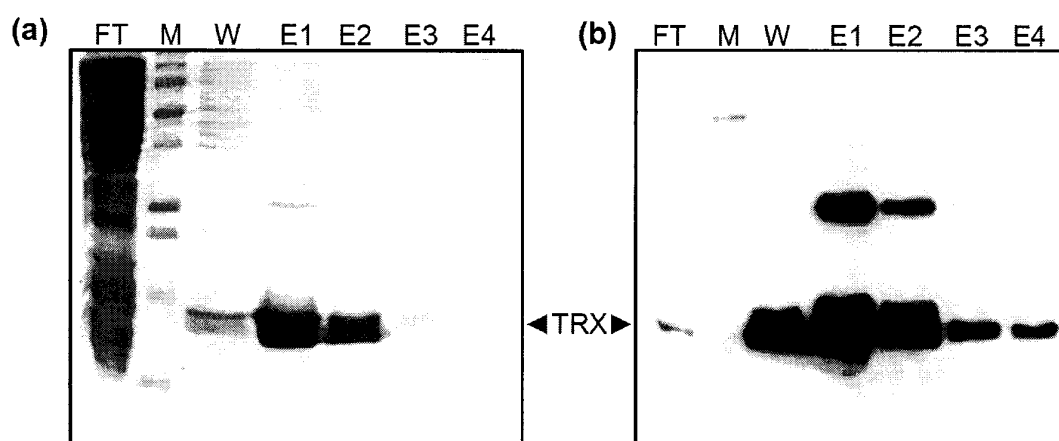


FIG. 8

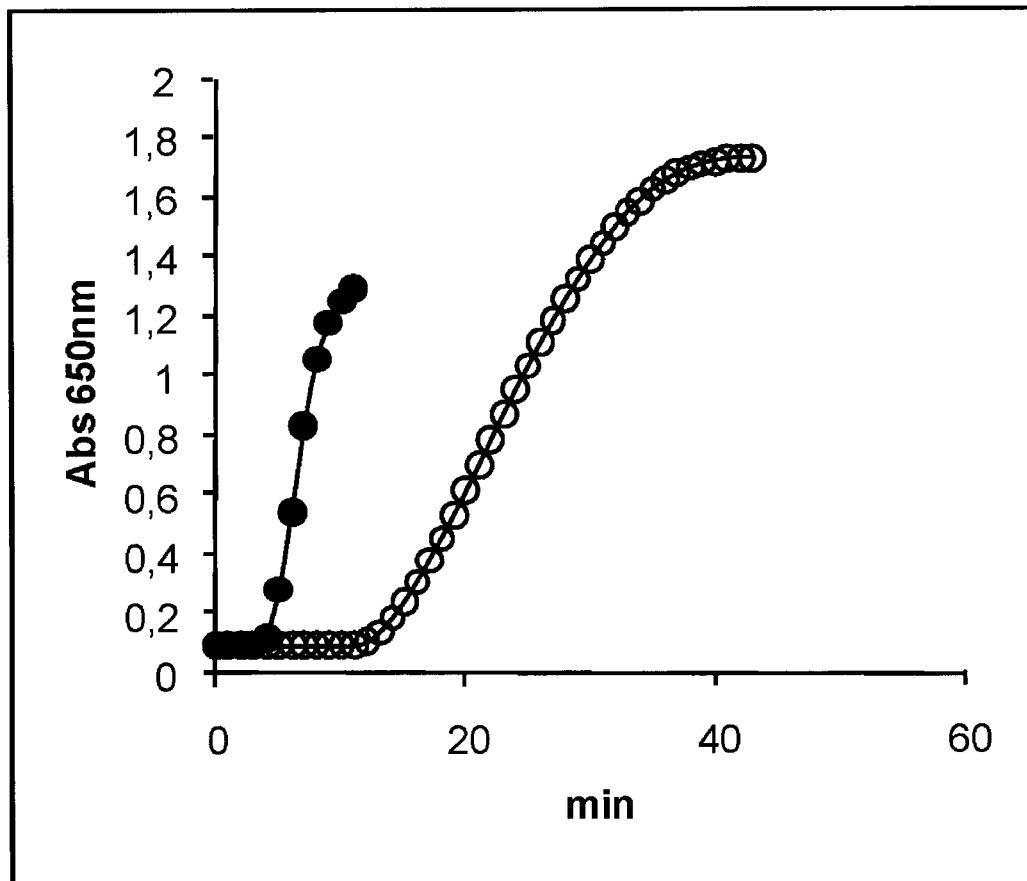
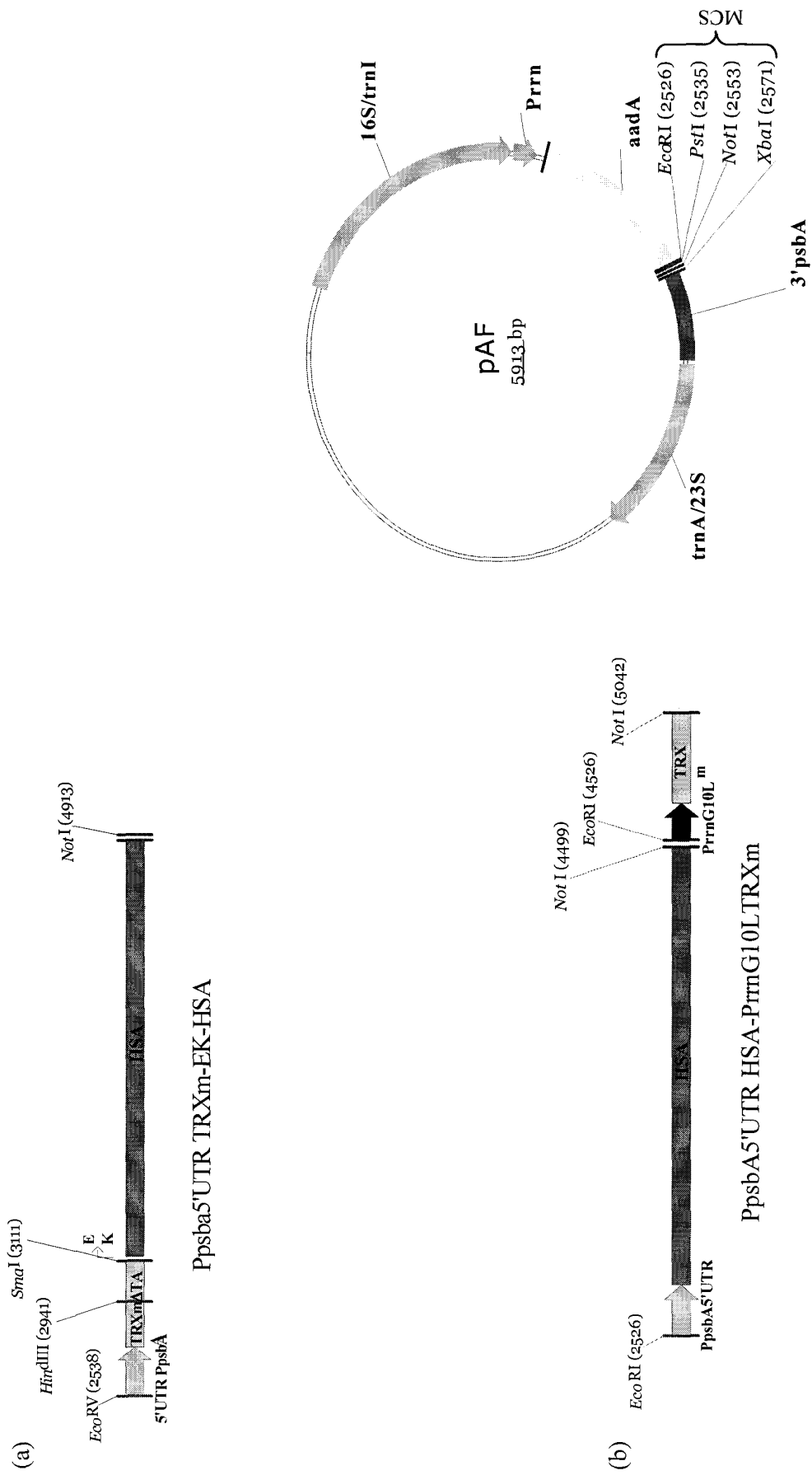


FIG. 9



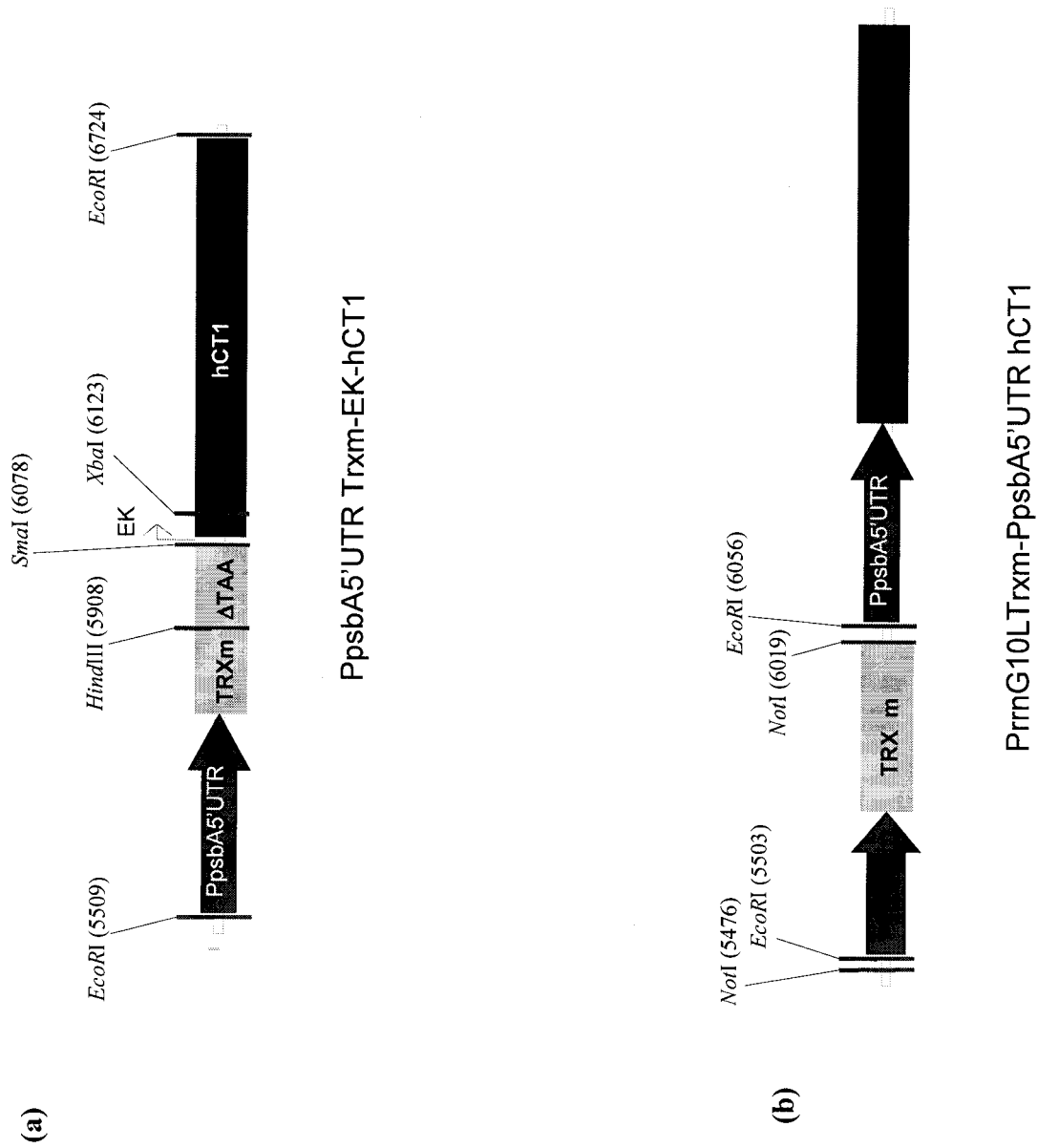


FIG. 11

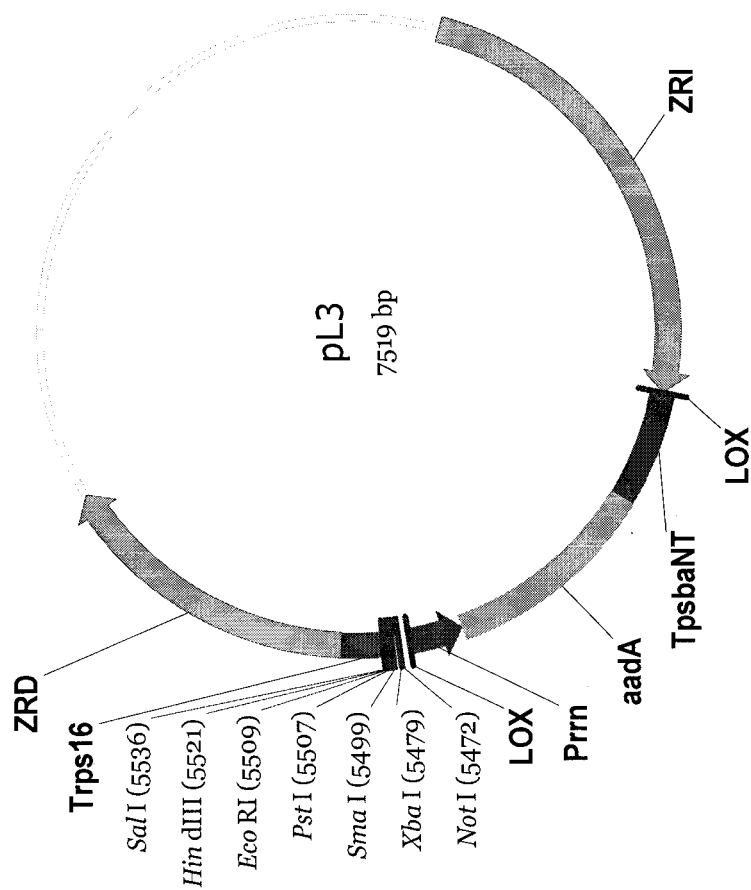


FIG.11 (CONT.)

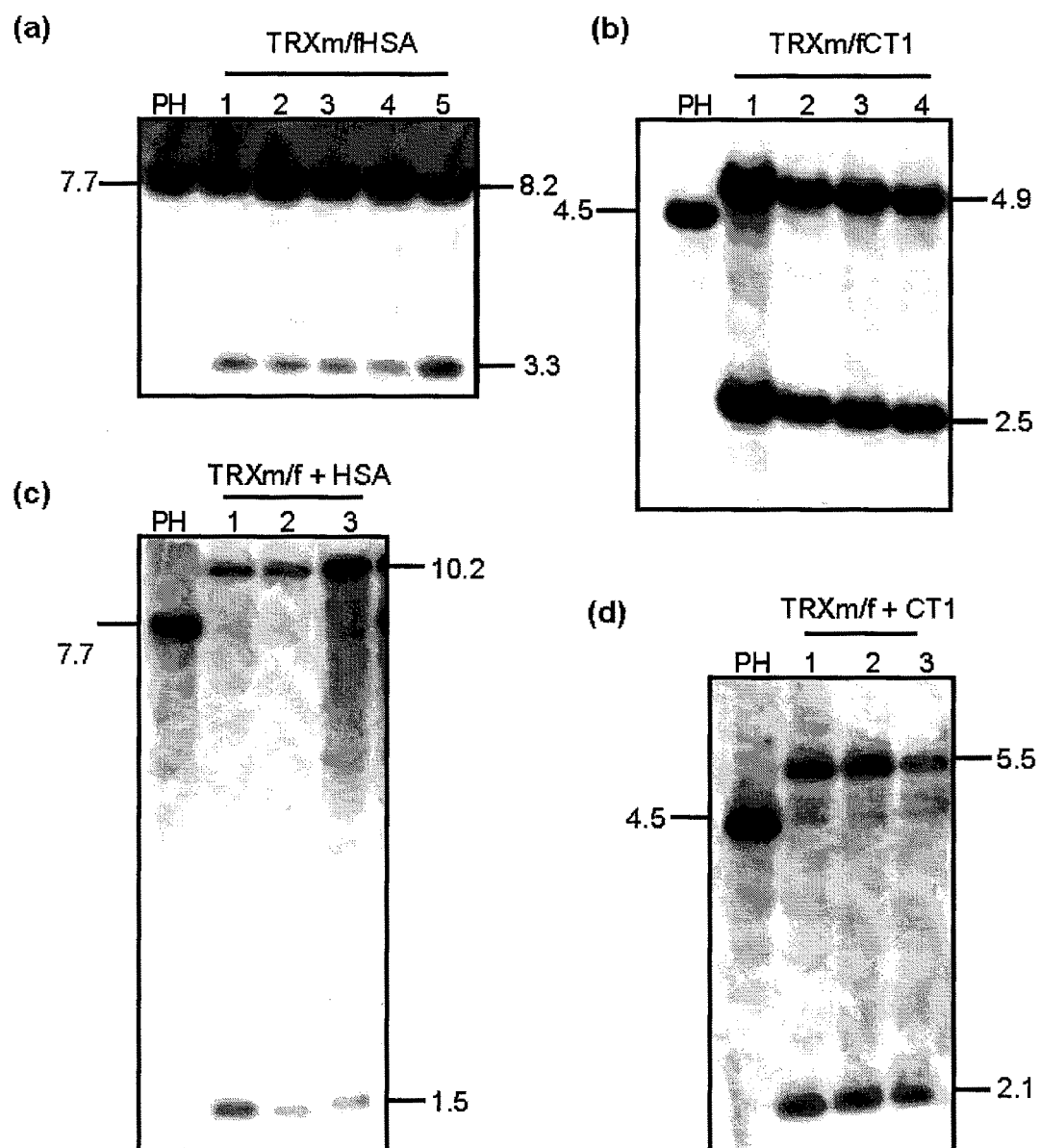
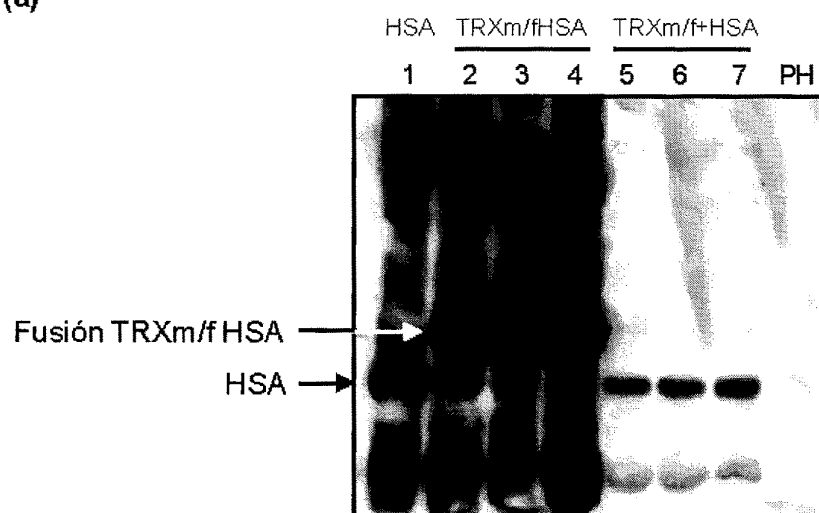


FIG. 12

(a)



(b)

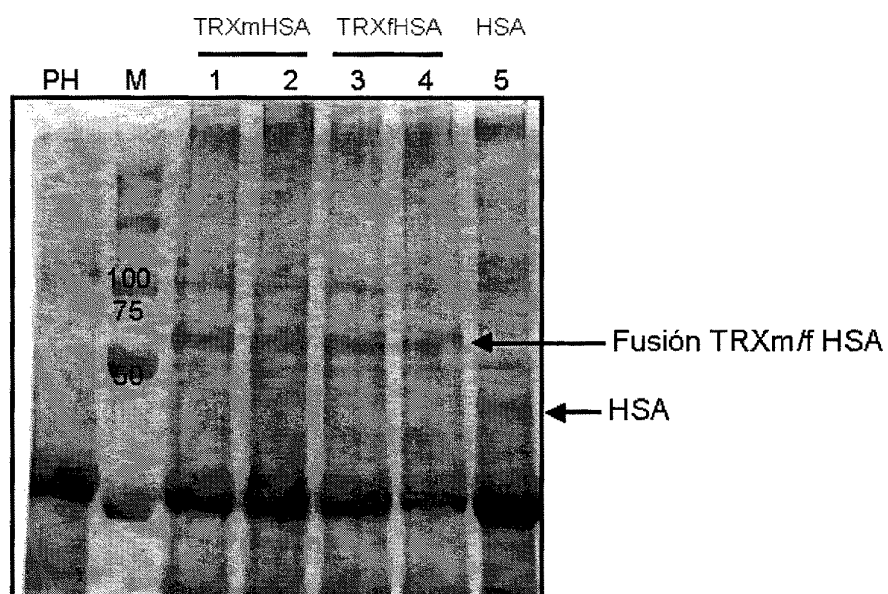


FIG. 13

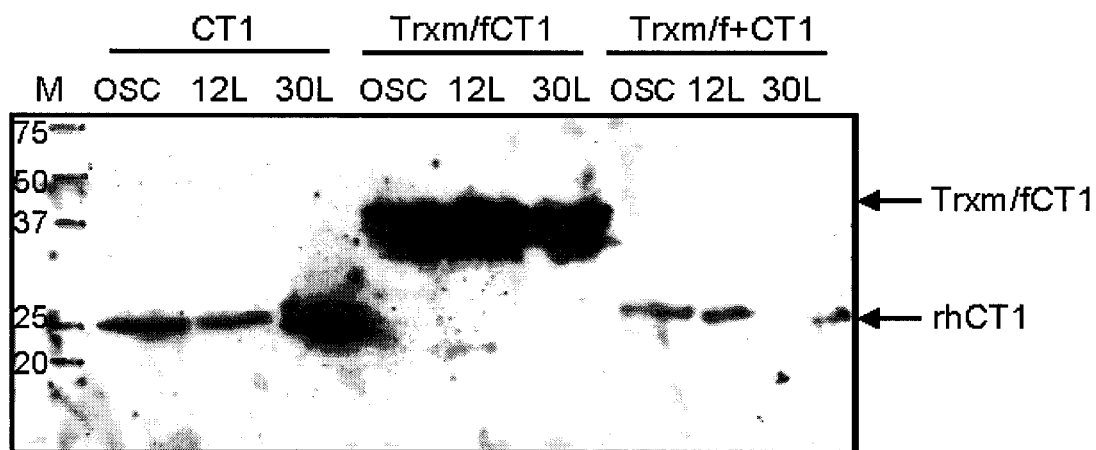


FIG. 14

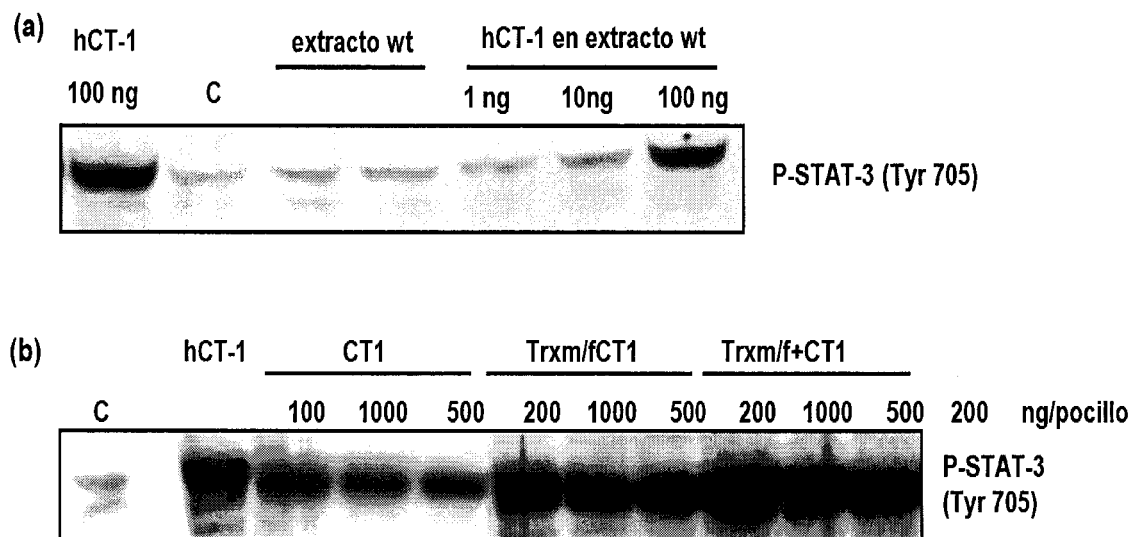


FIG. 15



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200801935

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.06.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|-------------------------------|
| A | BASE DE DATOS EMBL (en línea), OPPERMAN, C.H. et al. "Tobacco Genome Initiative (TGI) Nicotiana benthamiana ESTs". Recuperada de EBI, nº de acceso CN745656, en embl)[[embl-cc:CN745656]+-vn+2+-noSession">http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+([emblidacc-id:CN745656]>embl)[[embl-cc:CN745656]+-vn+2+-noSession . 21.05.2004. | 1-6 |
| A | BASE DE DATOS UNIPROT (en línea), WANG, Y.C. et al. "Cloning of thioredoxin gene (TRX) from Limonium bicolor and sequencing analysis". Recuperada de EBI, nº de acceso A7LNX7_9CARY, en http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[UNIPROT-acc:A7LNX7]+-vn+2 . 11.09.2007 | 1-6 |
| A | EP 1609867 A1 (UNIV. FENG CHIA) 28.12.2005, párrafos 0044-0047,0052. | 1-34,48-50 |
| A | WO 0250289 A1 (SEMBIOSYS GENETICS INC./SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 27.06.2002, Seq. 56; páginas 8-14,54-58,67. | 1-23,35-40, 44-49,51-55,59,60 |
| A | WO 2005011367 A1 (UNIV. CENTRAL FLORIDA) 10.02.2005, todo el documento. | 59-61 |
| A | FARRAN, I. et al. "High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potencial therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts". Plant Biotechnol. J. Volumen 6 Issue 5, Páginas 516-527. DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00334.x. Disponible en Wiley InterScience. http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1467-7652.2008.00334.x . 01.04.2008 Todo el documento | 58-60 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.02.2011

Examinador
M. Martín-Falquina Garre

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/415 (01.01.2006)**C12N9/02** (01.01.2006)**C12N15/82** (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, EPO-Internal, EBI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.02.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-61
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-61
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01 | BASE DE DATOS EMBL (En línea), OPPERMAN, C.H. et al. "Tobacco Genome Initiative (TGI) Nicotiana benthamiana ESTs". Recuperada de EBI, nº de acceso CN745656, en embl)[embl-acc:CN745656]+-vn+2+-noSession">http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+([emblidacc-id:CN745656]>embl)[embl-acc:CN745656]+-vn+2+-noSession | . 21.05.2004 |
| D02 | BASE DE DATOS UNIPROT (En línea), Wang, Y.C. et al. "Cloning of thioredoxin gene (TRX) from Limonium bicolor and sequencing analysis". Recuperada de EBI, nº de acceso A7LNX7_9CARY, en http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[UNIPROT-acc:A7LNX7]+-vn+2 | 11.09.2007 |
| D03 | EP1609867 (UNIV. FENG CHIA) | 28.12.2005 |
| D04 | WO0250289 (SEMBIOSYS GENETICS INC./SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) | 27.06.2002 |
| D05 | WO2005011367 (UNIV. CENTRAL FLORIDA) | 10.02.2005 |
| D06 | FARRAN, I. et al. "High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potencial therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts". Plant Biotechnol. J. Volumen 6 Issue 5, Páginas 516-527. DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00334.x | |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El documento D01 divulga una molécula de ácido nucleico que codifica una tioredoxina m cloroplástica cuya secuencia está muy alejada del 90% de identidad con SEQ ID Nº 7. A su vez, la secuencia divulgada en D02 no alcanza el 90% de identidad con SEQ ID Nº 6 ni con SEQ ID Nº 8. Por lo tanto dichas secuencias se consideran nuevas e inventivas (Arts. 6 y 8 LP).

Son documentos próximos a la invención: D03 sobre construcciones similares para coexpresar una tioredoxina conjuntamente con un segundo polipéptido en plastos de tabaco y D04 que divulga construcciones que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una tioredoxina y una segunda secuencia que codifica una proteína heteróloga o un enzima y los correspondientes vectores de expresión en E.coli. Por otra parte, D05 y D06 divulgan sistemas de expresión de HSA y hCT-1 recombinantes en cloroplastos de tabaco.

Sin embargo, no existe ninguna indicación que sugiera al experto en la materia la clonación de la secuencia de la Trx m objeto de la invención en los vectores de expresión divulgados en D03 o D04; ni lo descrito en D05 o D06 induciría al experto en la materia a desarrollar una construcción para la coexpresión en cloroplastos de plantas transformadas de los genes de la HSA o la hCT-1 junto con el de la tioredoxina m de la misma forma como lo hace la invención.

En consecuencia son nuevas e inventivas (arts. 6 y 8 LP) las siguientes reivindicaciones o grupos de reivindicaciones: las reivindicaciones 1-5 y 52 que están directamente relacionadas con las secuencias SEQ ID Nº 7, SEQ ID Nº 6 y SEQ ID Nº 8; las reivindicaciones 6-31 que se refieren a vectores para la expresión de Trx m o de otras proteínas heterólogas fusionadas con ella o coexpresadas en forma de polipéptidos independientes; las reivindicaciones 32-44 correspondientes a organismos transformados con construcciones que comprenden las citadas secuencias; las reivindicaciones 45-47 sobre el método de obtención de las plantas transgénicas y las reivindicaciones 48-51 y 53-57 relativas a el procedimiento para sobreexpresar Trx m o proteínas heterólogas.

Siguiendo el mismo razonamiento, la reivindicación 58 que se refiere al uso de las plantas transgénicas para la producción de cardiotrofina-1 humana recombinante (hCT-1), la reivindicación 59 sobre la composición farmacéutica que contiene la proteína recombinante y las reivindicaciones 60 y 61 sobre el método para producir albúmina sérica recombinante (HSA), cumplen igualmente los requisitos de novedad y actividad inventiva (Arts. 6 y 8 LP).